



# Identification et caractérisation des complexes transcriptionnels de la protéine TWIST1 essentiels à la progression tumorale

Laurent Jacqueroud

## ► To cite this version:

Laurent Jacqueroud. Identification et caractérisation des complexes transcriptionnels de la protéine TWIST1 essentiels à la progression tumorale. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10054 . tel-01163314

**HAL Id: tel-01163314**

**<https://theses.hal.science/tel-01163314>**

Submitted on 12 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 54-2015

Année 2015

## THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

ECOLE DOCTORALE  
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 17-04-2015

par

**Laurent Jacqueroud**

**Identification et caractérisation des complexes transcriptionnels de la protéine  
TWIST1 essentiels à la progression tumorale.**

JURY

Pr. Germain Gillet  
Dr. Annette Larsen  
Dr. Oliver Bischof  
Dr. Claude Sardet  
Dr. Patrice Lassus  
Dr Stéphane Ansieau  
Dr. Agnès Tissier

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-Encadrante de thèse

## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Germain Gillet d'avoir accepté de présider le jury mais également le Dr. Annette Larsen ainsi que le Dr. Oliver Bischof d'avoir été les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également le Dr. Claude Sardet et Dr. Patrice Lassus d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examineur. Je suis ravi de pouvoir vous compter dans le jury qui concrétisera mes études. Votre expertise, dans vos domaines respectifs, ainsi que la pertinence de votre jugement permettront d'engager une discussion enrichissante.

Je remercie également le Pr. Alain Puisieux d'avoir accepté de présider le jury. Au-delà de votre implication dans ce jury, je vous suis sincèrement reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Vous faites partie des enseignants de la Faculté de Pharmacie qui m'ont particulièrement marqué. Vos enseignements ont définitivement attisé ma curiosité pour le monde de la biologie moléculaire et en particulier le domaine de la cancérologie. Malgré toutes vos responsabilités et votre emploi du temps surchargé, vous êtes resté très disponible et avez toujours trouvé du temps quand je suis venu vous demander conseil. Je vous en remercie.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le Dr. Stéphane Ansieau pour m'avoir proposé de réaliser mon stage de Master 2 dans le laboratoire puis de m'accompagner en tant que Directeur de thèse. Stéphane, je te remercie pour toutes les corrections de mémoires, demandes et rapport de financement, revue et bien sur celle du manuscrit. Tu n'as jamais compté tes heures (quitte à t'attirer les foudres de Nora). Depuis le Master 2, tu t'efforces à me transmettre ton savoir ainsi que ton sens critique. Je me suis vu évolué et j'espère que tu le vois aussi. Ton bureau est toujours grand ouvert et tu trouves constamment le temps pour répondre à une question, donner un conseil, calmer un doute ou simplement écouter ce que l'on a dire. C'est une de tes grandes qualités. Je te remercie également pour ta bonne humeur à toute épreuve et ces moments passés à discuter de tout et de rien.

Ma gratitude va également au Dr. Agnès Tissier. Agnès, tu m'as pris sous ton aile lors de mon arrivée au laboratoire et m'a enseigné tout ce que je connais en terme d'expérimentation. Tu m'as appris à me poser les bonnes questions et à organiser mes manip (mais aussi mes présentations PowerPoint). Ta disponibilité à toute heure et ton soutien à toute épreuve me touchent profondément. Je te remercie également pour l'organisation annuelle du fameux « Barbecue d'Ambérieu en Bugey » et d'avoir instauré ce jeu auquel personne ne comprend rien qui s'appelle : « Je te prends ton cadeau de Noël ».

Mes remerciements vont ensuite à tous les membres présent et passés du laboratoire : Caroline, Anne-Pierre, Christiane, Christelle, Sylvaine et Arnaud pour tous les conseils scientifiques, parties de rire et bons moments en tout genre. Je n'oublie pas non plus les étudiants (Ebticem, Louise, Marion, Baptiste V, Manue et Roxane) et les membres de l'équipe Bernard avec qui je passe de très bons moments.

Je tiens à décerner une mention toute particulière aux pigeons (Guillaume, Baptiste, Arnaud). Je retiens de cette époque, nos fous rires en culture, nos soirées et autres moments de folies. Je vous remercie aussi pour nos longues discussions scientifiques et débats sur nos projets. Un groupe comme ça, ça ne se lâche pas malgré les changements de continents ou de cursus.

Mention spéciale toujours pour Florian le magicien, Clotilde, Froggy, Benjamin, Etienne, Aurélien, mon pote Geoffrey et tous les autres que je ne citerai pas. La thèse apporte pas mal de choses, mais c'est encore mieux quand elle vous apporte des amis. Je vous remercie pour tous ces moments d'anthologies vécus au sein mais aussi à l'extérieur du labo. J'espère que nous continuerons longtemps sur la même lancée.

J'ai une pensée pour mes comparses de pharma. Merci à Binômette, Nanou, Olivier, Mathilde et Lysiane mais aussi à mon Fred et mon Max. Je n'oublierai jamais cette première année de pharma où nous nous sommes tous rencontrés. Même si l'on ne se voit pas autant que nous le voudrions je suis heureux de pouvoir vous compter parmi mes amis proches. Merci aussi à mon compagnon de galère de la filière recherche, Simon. Nous nous sommes soutenus mutuellement tout au long de ce cursus semé d'embûches mais tellement passionnant. Merci mon vieux pour ton amitié.

Je remercie aussi Clément, Alexandre, Anaïs, Elyse et Bastien mais aussi Edouard, Sarah, Stéphanie et Papa Pierre que je ne vois pas assez souvent mais à qui je tiens énormément.

Pour finir, j'aimerais remercier les membres de ma famille pour leur soutien exceptionnelle tout au long de ces années. Papa, Maman, je vous remercie pour votre éducation, votre soutien et votre amour. Vous avez fait de moi quelqu'un de bien, enfin je l'espère. Je vous remercie de m'avoir encouragé et porté lors du concours mais aussi par la suite. Vous m'avez offert des conditions exceptionnelles afin de m'épanouir. Je vous aime fort

J'embrasse bien sûr mon frère et ma sœur. Merci de faire semblant de comprendre ce que je fais, je me sens moins anormal du coup. Plus sérieusement, je suis très fier de vous. Michel, Londres a fini par t'offrir enfin ses faveurs. On ne se voit pas assez, mais saches que tu peux compter sur moi comme je sais que tu seras toujours là pour moi. Je t'aime fort frérot.

Céline, si le tombeau de Ramsès te résiste, tu pourras toujours te reconverter dans le blind test musical. En tout cas, ça fait du bien d'avoir un scientifique à qui parler à la maison et je sais que tu arriveras à mener de front tes deux cursus. Tu sais que tu peux venir me voir à tout moment et pour quoi que ce soit. Je t'aime très fort sœurette.



Ich denke auch feste an meine Großeltern (Omi und Opa), Tante Dosi und Onkel Erwin aber natürlich auch an meine Tante Ruth. Ihr ward immer da für mich und dafür bin ich sehr dankbar. Es ist nicht immer einfach uns zu sehen und ihr fehlt mir schon ein bisschen. Ich habe euch sehr lieb.

Je remercie également mes grand parents qui ont participé à faire de moi qui je suis. Manou, les grands repas de famille à Tarare me manquent. J'ai une pensée émue pour mon Papi qui me manque énormément et à qui je dédie cette thèse pour avoir su aiguïser ma curiosité et mon goût pour la science dès mon plus jeune âge.

Je pense bien sûr à mes cousins Estragnat ainsi qu'aux familles Pfefferkorn et Bondoux ; je vous porte dans mon cœur.

Enfin, je remercie celle qui partage ma vie depuis 11 ans déjà et je l'espère pour encore de nombreuses années, ma Christelle. Je t'aime.

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

## **I. Table des matières**

<b>I. Table des matières .....</b>	<b>3</b>
Table des Figures .....	5
1ère partie : Les mécanismes de sauvegarde cellulaires. ....	6
<b>I. La sénescence. ....</b>	<b>7</b>
<b>I.1. La sénescence rélicative. ....</b>	<b>8</b>
<b>I.2. La sénescence oncogénique. ....</b>	<b>11</b>
<b>I.3. Caractéristiques des cellules sénescents. ....</b>	<b>12</b>
<b>I.4. Mécanismes d'induction de la sénescence ....</b>	<b>16</b>
<b>I.5. Un focus sur le locus INK4A/ARF/INK4B. ....</b>	<b>20</b>
<b>II. L'apoptose. ....</b>	<b>23</b>
<b>II.1. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale. ....</b>	<b>24</b>
<b>II.2. La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. ....</b>	<b>25</b>
<b>III. Mécanismes d'échappement à la sénescence et l'apoptose ....</b>	<b>27</b>
<b>IV. Restauration des mécanismes de sauvegardes comme approches thérapeutique. ....</b>	<b>29</b>
2ème partie : La transition épithélio-mésenchymateuse. ....	34
<b>I. Quelques notions sur la transition épithélio-mésenchymateuse. ....</b>	<b>35</b>
<b>II. Les fonctions de l'EMT dans le développement tumoral. ....</b>	<b>42</b>
<b>II.1. Rôle de l'EMT dans la dissémination métastatique. ....</b>	<b>42</b>
<b>II.2. Mécanisme d'activation de l'EMT. ....</b>	<b>46</b>
<b>II.3. EMT et dédifférenciation ....</b>	<b>51</b>
<b>II.4. Les propriétés oncogéniques de l'EMT ....</b>	<b>52</b>
<b>II.5. EMT et chimiorésistance ....</b>	<b>56</b>
3ème partie : Les protéines TWIST. ....	60
<b>I. Structure. ....</b>	<b>61</b>
<b>II. Fonctions de la protéine TWIST1 dans le développement embryonnaire. ....</b>	<b>65</b>
<b>III. Fonctions post-natales de la protéine TWIST1. ....</b>	<b>67</b>
<b>IV. Pathologies associées à une perte d'expression des gènes TWIST ....</b>	<b>68</b>
<b>IV.1. Syndrome de Saethre-Chotzen ....</b>	<b>68</b>
<b>IV.2. Syndrome de Setleis. ....</b>	<b>70</b>
<b>V. Propriétés pro-métastatiques et oncogéniques des protéines TWIST ....</b>	<b>71</b>
<b>V.1. III.1 Réactivation des gènes TWIST dans les cancers. ....</b>	<b>71</b>

<b>V.2. Propriétés pro-métastatiques .....</b>	<b>72</b>
<b>V.3. Propriétés oncogéniques .....</b>	<b>72</b>
<b>VI. Régulation de l'activité de la protéine TWIST1. ....</b>	<b>77</b>
<b>VI.1. Modifications post-traductionnelles et régulation de la stabilité de la protéine. ....</b>	<b>77</b>
<b>VI.2. Répercussions de la phosphorylation de la protéine TWIST1 sur son activité.....</b>	<b>79</b>
<b>VI.3. Dimérisation : cas particulier de l'homodimère TWIST1-TWIST1 et de l'hétérodimère TWIST1-E12.....</b>	<b>80</b>
<b>4ème partie : Les Résultats.....</b>	<b>83</b>
<b>I. Manuscrit de l'article.....</b>	<b>86</b>
<b>5ème partie : Discussion.....</b>	<b>141</b>
<b>6ème partie : Annexes .....</b>	<b>152</b>
<b>I. Snail family members unequally trigger EMT and thereby differ in their ability to promote the neoplastic transformation of mammary epithelial cells. ....</b>	<b>153</b>
<b>II. Correspondances en Onco-théranostic.....</b>	<b>165</b>
<b>La transition épithélio-mésenchymateuse : de la plasticité à la chimiorésistance .....</b>	<b>165</b>
<b>III. Thérapie ciblée des cancers. ....</b>	<b>173</b>
<b>La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigenèse.....</b>	<b>173</b>
<b>7ème partie : Bibliographie .....</b>	<b>191</b>

## **Table des Figures**

Figure 1: Structures des télomères et de la télomérase. ....	10
Figure 2: La réactivation de la protéine p53 conduit à la régression de tumeurs hépatiques.....	13
Figure 3: Les effets ambivalents du SASP sur la progression tumorale. ....	15
Figure 4: Schématisation des voies impliquées dans l'induction du phénomène de sénescence oncogénique. ....	17
Figure 5 : Les systèmes de sauvegarde cellulaire inhibent la reprogrammation nécessaire à la formation d'iPS. ....	19
Figure 6 : Organisation structurale du locus INK4. ....	21
Figure 7: Description des voies de régulation de l'apoptose intrinsèques et extrinsèques. ....	26
Figure 8 : La protéine p53 est cœur d'un réseau transcriptionnel impliqué dans l'induction des phénomènes de sénescence et/ou d'apoptose. ....	28
Figure 9 : Restauration de l'activité de la protéine p53. ....	31
Figure 10 : La transition épithélio-mésenchymateuse, un mécanisme de transdifférenciation cellulaire.....	36
Figure 11: EMT et embryogenèse. ....	37
Figure 12 : Représentation schématique des types de jonctions entre cellules épithéliales.....	39
Figure 13 : Représentation schématique de l'interconnexion des voies de signalisation régulant le programme d'EMT. ....	40
Figure 14: Régulation du programme d'EMT.....	41
Figure 15: La colonisation métastatique requiert un retour vers un statut épithélial (MET). ....	45
Figure 16 : Le concept de dissémination métastatique précoce.....	47
Figure 17: Mise en parallèle des propriétés associées à l'EMT au cours de l'embryogenèse et de la tumorigenèse. ....	48
Figure 18: Conséquences liées à l'induction des programmes d'EMT et de MET au cours de la progression tumorale.....	53
Figure 19 : Inhibition des systèmes de sauvegarde cellulaires par les facteurs de transcription embryonnaires. ....	54
Figure 20: Comparaison des stratégies thérapeutiques standard et combinée. ....	57
Figure 21: Mécanismes divers par lesquels l'EMT favorise la résistance aux traitements thérapeutiques.....	59
Figure 22: Organisation structurale des protéines TWIST1 et TWIST2. ....	62
Figure 23 : Fonctions antagonistes des complexes TWIST1 homodimérique et hétérodimérique au cours de la fusion des os plats du crâne.....	64
Figure 24: Cheminement de la progression tumorale dépendante des facteurs de transcription embryonnaires. ....	76

## **1ère partie : Les mécanismes de sauvegarde cellulaires.**

Afin de lutter contre le développement tumoral, les cellules de l'organisme ont développé des mécanismes de sauvegarde tels que l'apoptose et la sénescence cellulaire. Ces mécanismes onco-suppresseurs, permettant de maintenir une homéostasie tissulaire, sont induits dans les lésions pré-néoplasiques et ont pour vocation d'éliminer des cellules génétiquement altérées constituant un risque pour l'organisme (Bartkova et al., 2005; Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005).

## **I. La sénescence.**

Le phénomène de sénescence (du latin « senex » qui signifie ancien, vieux ou âgé) a été décrit il y a maintenant cinquante ans par Leonard Hayflick et Paul Moorhead à la suite de la mise en culture *in vitro* de fibroblastes humains diploïdes normaux. Ils mirent en évidence une capacité de prolifération limitée des cellules en culture. Après approximativement cinquante-cinq doublements de population, ces cellules adoptent une morphologie caractéristique associée à un arrêt de prolifération irréversible nommé « limite de Hayflick » ou « sénescence répllicative », tout en restant viables et en conservant une activité métabolique (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961). La sénescence était donc décrite comme un processus physiologique lié au vieillissement des cellules et de ce fait de l'organisme. Au cours des années, d'autres types de sénescence non reliés au vieillissement ont été mis à jour. C'est ainsi que l'on différencie la sénescence associée au vieillissement, dite « répllicative », de la sénescence prématurée liée à divers stress. Les signaux à l'origine de l'engagement des cellules dans un programme de sénescence sont multiples et divers mais les voies de signalisation mises en jeu restent sensiblement les mêmes.

## **I.1. La sénescence répllicative.**

Les observations de Hayflick et Moorhead ont été étayées par les travaux de plusieurs équipes ayant mis en évidence une corrélation entre la sénescence répllicative et une architecture spécifique de l'extrémité des chromosomes, les télomères. Cette corrélation entre répllication et télomères fût proposée pour la première fois par Olovnikov en 1971 (article en Russe ; se référer à (Olovnikov, 1996)). Ces travaux suggérèrent que l'activation du phénomène de sénescence répllicative est due au raccourcissement des télomères. Ces résultats furent confirmés par les travaux de Greiger (Bodnar et al., 1998). Ce n'est que huit ans plus tard que plusieurs travaux démontrèrent effectivement que l'expression ectopique de la sous-unité catalytique de la télomérase, enzyme impliquée dans la répllication des télomères, dans des cellules épithéliales humaines, permettait d'abroger leur érosion, d'allonger la durée de vie des cellules et d'outrepasser l'arrêt de prolifération (Bodnar et al., 1998; Vaziri and Benchimol, 1998).

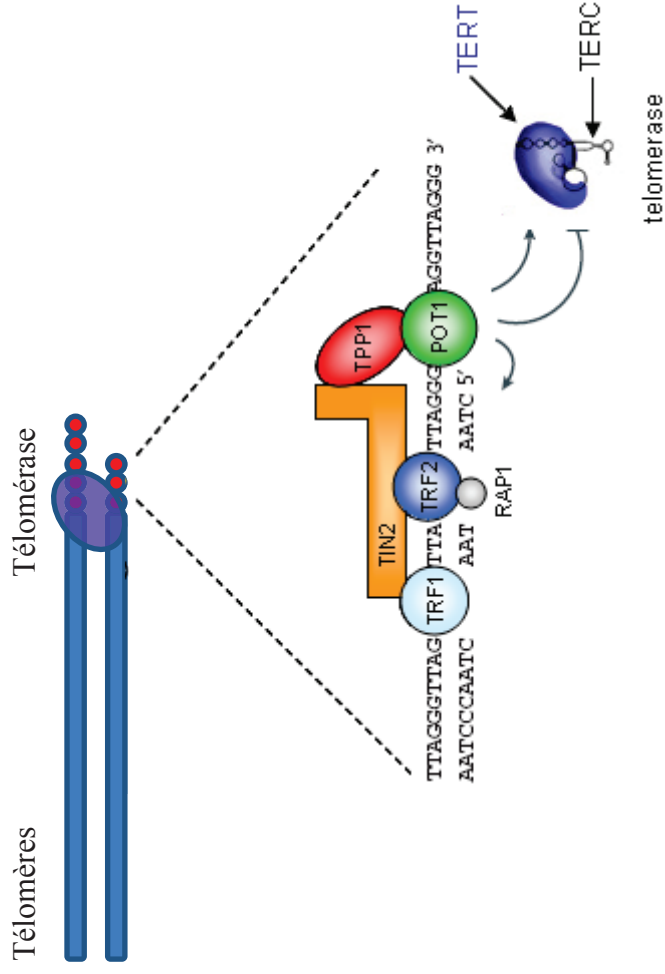
Ces structures particulières de l'ADN chromosomique que représentent les télomères furent découvertes lors de la première moitié du vingtième siècle grâce aux travaux distincts de Herman Müller et de Barbara McClintock respectivement Prix Nobel en 1945 et 1983. Leur hypothèse était la suivante : ces structures permettent de prévenir la fusion des chromosomes et ainsi assurer une ségrégation correcte du matériel génétique lors de la mitose. Les télomères (du grec *telos* « extrémité » et *meros* « partie »), nom donné par Müller à ces structures, permettent également à la cellule de différencier l'ADN au niveau des chromosomes de fragments d'ADN issus de cassures double-brin qui doivent être réparés pour sauvegarder l'intégrité du génome. En effet, les extrémités des télomères contiennent une structure d'ADN mimant une cassure double-brin. Les cassures double-brin induisent l'activation des voies de dommages à l'ADN afin de permettre la réparation de ces altérations. Ces mêmes voies sont également impliquées dans la sénescence répllicative (Brown et al., 1997; Herbig et al., 2004). En effet, l'expression de protéines telles que 53BP1, ATM, MDC1 et NBS1 corrèle avec l'absence de coiffage des télomères. De plus, des cellules entrées en senescence répllicative arborent des formes actives des protéines CHK1 et CHK2 (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003). En cela, les télomères en condition physiologique peuvent potentiellement être reconnus et traités comme d'éventuelles cassures et doivent donc être protégés de ce système (de Lange, 2009; Lydall,



2009). Dans le cas contraire, les cellules seraient arrêtées de façon permanente dans le cycle cellulaire. De plus, les tentatives de « réparation » des extrémités chromosomiques auraient des conséquences dévastatrices au regard de l'intégrité du génome.

Les télomères sont donc des structures de protection coiffant l'extrémité de tous les chromosomes eucaryotes (ainsi que certaines structures chromosomiques bactériennes). Ils contiennent des séquences nucléotidiques répétées permettant aux extrémités chromosomiques d'être répliquées malgré la nature unidirectionnelle de la réplication et cela grâce à la télomérase. Cette enzyme organisée en un complexe ribonucléoprotéique comprend une sous-unité ribosomique appelé TERC (TElomerase RNA Component) servant de matrice à la synthèse des répétitions télomériques ainsi qu'une sous-unité catalytique TERT (TElomerase Reverse Transcriptase) qui en assure la synthèse. L'activité de la télomérase est principalement dictée par l'expression de *TERT*, *TERC* semblant être transcrit de manière ubiquitaire (Figure 1).

L'inhibition de l'érosion des télomères par la surexpression de la télomérase est nécessaire à l'immortalisation de divers types cellulaires. En effet, la durée de vie limitée de la plupart des cellules humaines primaires s'explique par le fait que, contrairement aux cellules souches, la télomérase n'est pas exprimée dans les cellules somatiques humaines, ainsi elles sont incapables de maintenir les télomères à une longueur suffisante pour supprimer le mécanisme de sénescence (Harley et al., 1990; Masutomi et al., 2003; Wright et al., 1996). En revanche, les cellules cancéreuses sont connues pour maintenir la longueur de leurs télomères soit en exprimant la télomérase soit en développant un mécanisme alternatif appelée ALT (Alternative Lengthening Telomeres), ce qui a pour effet de conduire à leur immortalisation. Peu de données concernant ce mécanisme alternatif existent mais un certain nombre d'études s'accordent à dire que ce processus alternatif est basé sur la recombinaison homologue (Pour revue : (Cesare and Reddel, 2010)).



**Figure 1: Structures des télomères et de la télomérase.**

Les télomères sont constitués de répétitions TTAGGG, orientées de 5' en 3' constituant l'extrémité des chromosomes. La structure des télomères est maintenue par un complexe dit « shelterin » composé des six protéines TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 et POT1. La longueur des télomères est maintenue par une enzyme appelée télomérase, une ribonucléoprotéine composée d'ARN matriciel (TERC) et d'une sous-unité catalytique possédant une activité transcriptase inverse (TERT) permettant la synthèse de l'ADN grâce à l'addition des séquences répétées.

Figure adaptée de Deng, Y. et al., *Nat Rev Cancer* 2008.

## **I.2. La sénescence oncogénique.**

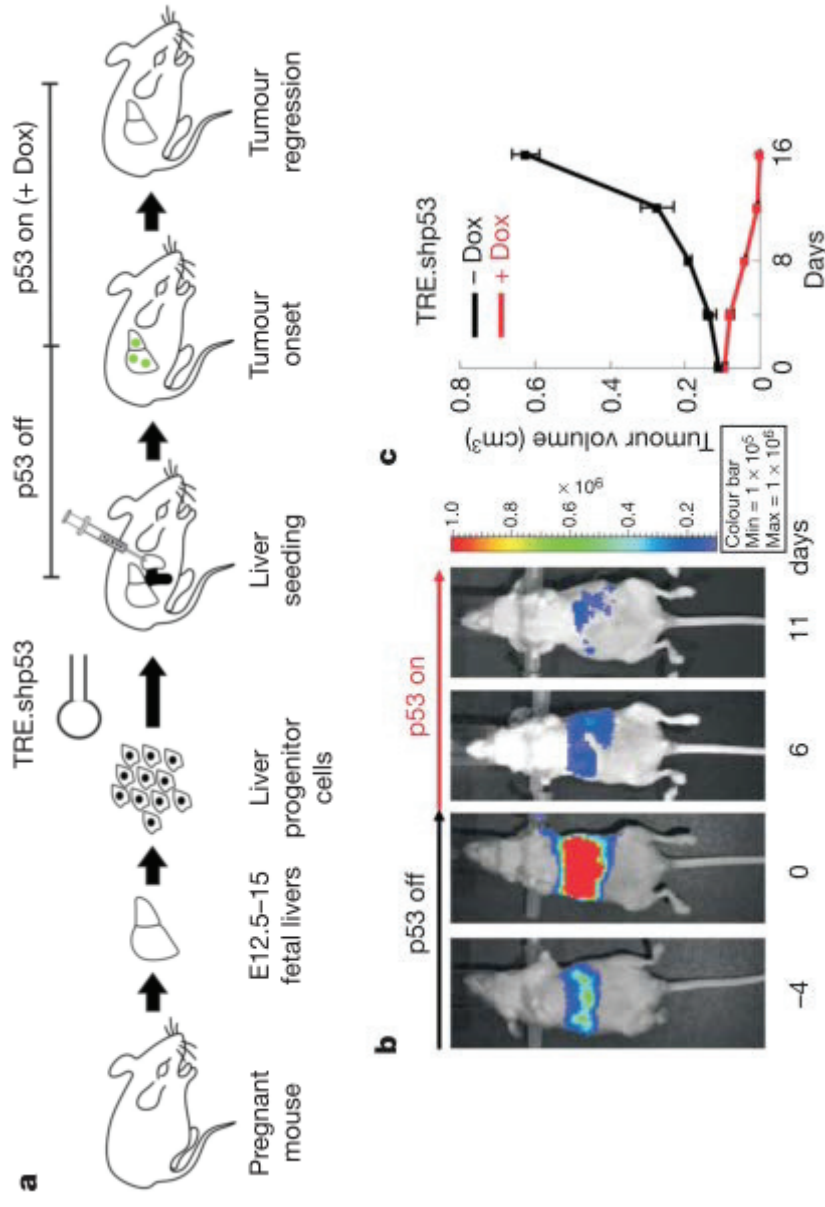
Ce phénomène particulier de sénescence a été décrit pour la première fois par Serrano *et al.*, en 1997 (Serrano et al., 1997). Ils observèrent que l'expression de la version constitutivement activée de l'oncoprotéine Ras (H-Ras<sup>G12V</sup>) dans des fibroblastes humains primaires conduisait à l'induction d'un phénotype similaire à celui observé lors de l'engagement de cellules en sénescence répllicative. Ces observations furent réitérées lors de l'expression d'autres protéines mitogéniques telles que les versions activées des kinases ERBB2 ou Raf, ou de la  $\beta$ -caténine (Lin et al., 1998; Trost et al., 2005; Zhu et al., 1998). Cependant, la sénescence induite par ces signaux mitogéniques (Oncogene-Induced-Senescence, OIS) ne peut être contrecarrée par l'expression de la protéine hTERT, démontrant que ce type de sénescence est indépendant de la longueur des télomères (Wei and Sedivy, 1999).

Bien que de nombreuses observations faites *in vitro* suggéraient que l'OIS pourrait représenter un système de sauvegarde capable de s'opposer aux effets oncogéniques de certaines protéines mitogéniques, les manifestations *in vivo* faisaient défaut. Les premières évidences d'un rôle suppresseur de tumeur *in vivo* de l'OIS ont été publiées en 2005 par l'équipe de Pier Paolo Pandolfi et Clemens Schmitt. Ces derniers ont démontré que la perte du suppresseur de tumeur *PTEN* dans la prostate de souris (Pb-Cre x Pten<sup>loxP/loxP</sup>) ou l'activation de la protéine N-RAS dans les lymphocytes (souris E $\mu$ -N-MYC) conduisait au développement de tumeurs pré-malignes composées de nombreuses cellules sénescents (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005). Ces études ont ensuite été étendues à d'autres oncoprotéines (B-RAF, K-RAS, c-MYC) (Di Micco et al., 2006; Michaloglou et al., 2005; Vafa et al., 2002) et d'autres modèles cellulaires. Divers marqueurs de sénescences sont invariablement exprimés dans les lésions pré-néoplasiques et sont perdus au cours de la conversion maligne, démontrant ainsi le rôle majeur de la sénescence comme barrière physiologique contre le développement tumoral (Bartkova et al., 2005; Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005; Michaloglou et al., 2005). Sur la base de modèles transgéniques ou de transplantation de cellules dans lesquelles l'expression de la protéine p53 est modulable, plusieurs études ont démontré que la réactivation de p53 *in vivo* dans des tumeurs est suffisante, dans ces modèles simplifiés, pour réactiver les programmes de sénescence ou d'apoptose selon le contexte cellulaire, conduisant à la régression de la tumeur (Figure 2) (Dankort et al., 2007; Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). En cela,

l'échappement aux systèmes de sauvegarde est non seulement un prérequis à la conversion maligne mais doit être maintenu afin d'assurer la survie et la prolifération des cellules tout au long de la progression tumorale. En outre, Xue et collaborateurs ont observé une activation de la réponse immunitaire innée après réactivation de p53, qu'ils pensent être responsables de l'élimination des cellules sénescents. Un article de 2010 publié dans *Cancer Cell* par le groupe de Clemens Schmitt corrobore cette observation en affirmant que les systèmes de sauvegarde que sont la sénescence et l'apoptose s'associent à la réponse immunitaire innée afin d'inhiber la progression tumorale (Reimann et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs montrent par ailleurs que les deux mécanismes de sauvegarde ne sont pas exclusifs et peuvent coopérer pour inhiber la prise tumorale.

### **I.3. Caractéristiques des cellules sénescents**

L'identification de cellules sénescents repose sur un ensemble de marqueurs phénotypiques et moléculaires précis. La sénescence est caractérisée par de profondes modifications cytomorphologiques, telles que l'aplatissement cellulaire, la vacuolisation du cytoplasme ou encore l'augmentation du volume nucléaire (Cristofalo and Kritchevsky, 1969). Divers articles scientifiques ont également observé une augmentation du nombre de Golgi et des lysosomes (Cristofalo et al., 1969). Dimri et collaborateurs ont également identifié, dans les cellules sénescents, une activité  $\beta$ -galactosidase histochimiquement détectable à pH 6,0, alors que pour les cellules saines, l'activité enzymatique est détectable à un pH de 4 (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000). Il a récemment été démontré que cette enzyme ne possédait pas d'effet propre dans l'induction du phénomène (Lee et al., 2006). A cela s'ajoute l'utilisation de marqueurs moléculaires tels que l'augmentation du taux d'inhibiteurs de cyclines-kinases (p16<sup>INK4A</sup> et p21<sup>CIP1</sup>), ainsi que d'autres protéines (récepteur leurre « decoy receptor » DcR2, Dec1) (Collado et al., 2005). Une étude récente a, par ailleurs, permis de démontrer qu'un processus de « mitose slippage » était associé à l'entrée des cellules en sénescence, de fait tétraploïdes (Johmura et al., 2014).



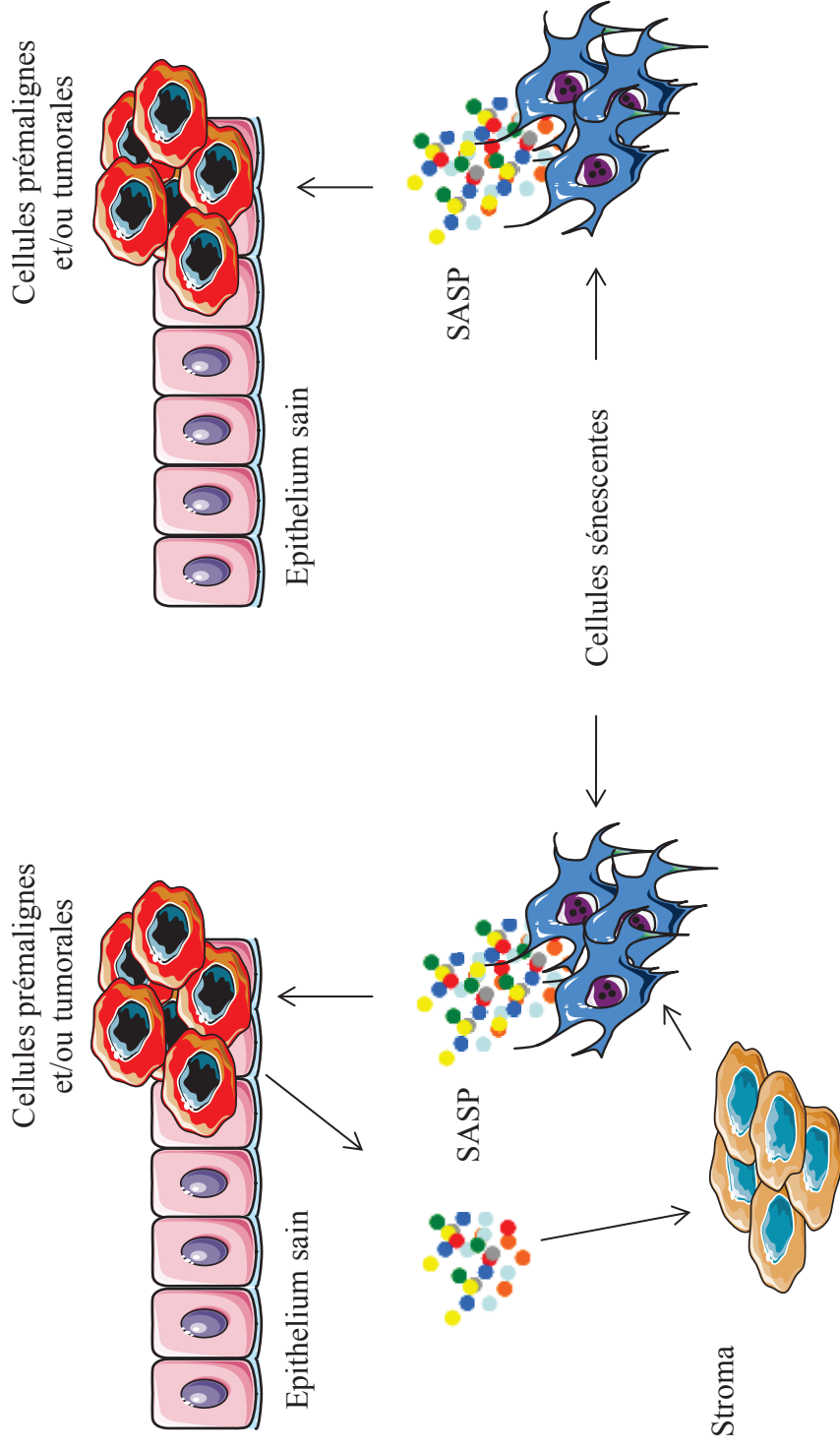
**Figure 2:** *La réactivation de la protéine p53 conduit à la régression de tumeurs hépatiques.*

L'injection orthotopique d'hépatoblastes infectés par des vecteurs d'expression de l'oncoprotéine RAS et d'un shRNA dirigé contre la protéine p53 (shp53) conduit à la formation d'hépatocarcinomes invasifs. La réactivation de l'expression de p53 dans ces cellules induit une régression rapide (en 12 jours) des tumeurs à en juger par les études de bioluminescence extracorporelle.

Figure issue de Xue W. et al., *Nature* 2007.

Une des répercussions majeures de la sénescence est l'acquisition, par les cellules concernées, d'un phénotype sécrétoire spécifique (ou SASP, selon l'acronyme anglais Senescence associated Secretory Phenotype) pouvant moduler le microenvironnement. Au-delà des chémokines permettant la chémo-attraction et la diapédèse des cellules de l'immunité, les facteurs sécrétés par les cellules sénescents constituent un stress capable de sensibiliser les cellules avoisinantes favorisant ainsi leur entrée en sénescence. Cela réduit le risque que des cellules altérées et potentiellement néoplasiques échappent à l'induction du phénomène de sénescence. Parallèlement, les cellules stromales, au contact des cytokines du secrétome, synthétisent un certain nombre de facteurs inhibant la croissance de cellules pré-malignes et contribuent ainsi à la mise en œuvre d'une réponse de sénescence plus globale (Kuilman and Peeper, 2009).

Malgré le rôle indéniable de ce secrétome dans l'OIS, il semblerait que les cellules tumorales soient capables de le détourner afin d'entretenir leur prolifération (Sparmann and Bar-Sagi, 2004; Yang et al., 2006). En effet, certaines cellules tumorales secrètent quelques-uns de ces facteurs. Elles peuvent ainsi conduire à l'induction de sénescence dans des cellules stromales environnantes, telles que les fibroblastes. Ceux-ci secrètent à leur tour, des facteurs qui contribuent à la croissance de la tumeur. Ce modèle de communication bidirectionnelle entre les cellules tumorales et les cellules stromales expliquerait donc pourquoi plusieurs études ont démontré que les cellules tumorales expriment couramment plusieurs facteurs du SASP. En se basant sur ce concept, divers stress tels que le vieillissement, peuvent conduire à une augmentation du nombre de cellules sénescents, ce qui pourrait par la suite stimuler l'expansion de cellules précancéreuses et ainsi expliciter le lien entre vieillissement et pathologies cancéreuses (Figure 3).



**Figure 3: Les effets ambivalents du SASP sur la progression tumorale.**

Les propriétés oncosuppressives du SASP résident dans sa contribution au maintien d'un phénotype sénescence et au recrutement de cellules immunitaires contribuant à l'élimination des cellules altérées. Son effet pro-tumoral du SASP résulte de sa capacité à favoriser l'entrée des cellules stromales en sénescence qui en conséquence produisent des cytokines favorables à la croissance tumorale. Le SASP issu des cellules cancéreuses pourrait également augmenter le pool de cellules sénescences présentes au cœur de la tumeur et ainsi conduire à l'établissement d'un microenvironnement favorisant la progression tumorale. Il est probable que ces deux hypothèses coexistent.

Figure adaptée de Kuilman T. & Peeper DS., *Nat. Rev. Cancer* 2009.



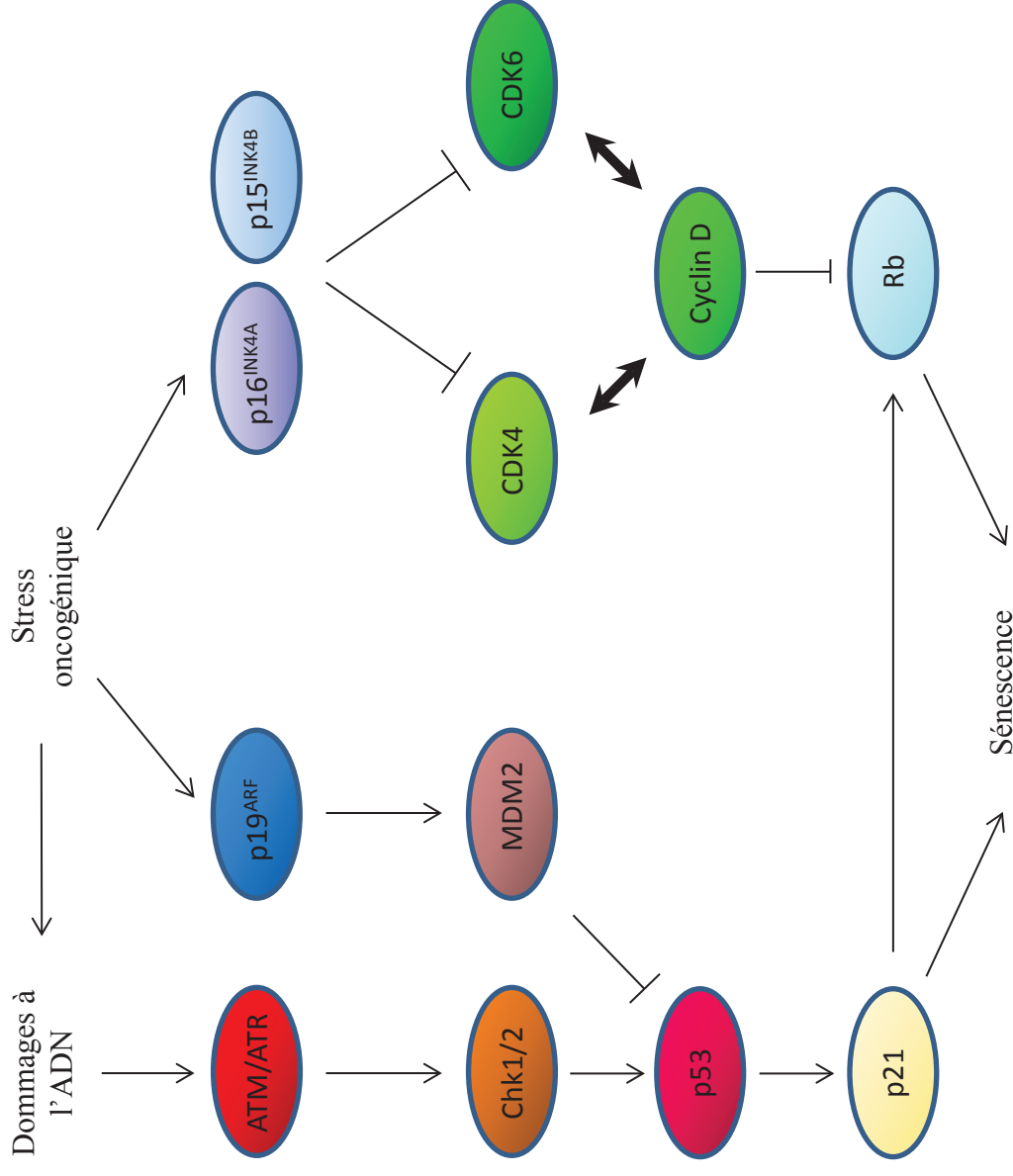
#### **I.4. Mécanismes d'induction de la sénescence**

De nombreuses études ont permis de décortiquer les mécanismes impliqués dans l'induction de l'OIS. Il a dans un premier été proposé que l'OIS résultait de l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN suite à une hyper-réplication liée à des stress mitogéniques. Ainsi, les dommages à l'ADN aboutissent à l'activation des voies ATM/ATR qui se trouvent être en amont des voies oncosuppressives p53/p21<sup>CIP1/WAF1</sup> et p16<sup>INK4A</sup>/RB (Di Micco et al., 2006; Serrano et al., 1997). Ces deux inhibiteurs de cycline kinase (CDK4 et CDK6 respectivement) conduisent à une inhibition par hypophosphorylation de la protéine RB, et l'inhibition active des gènes cibles du facteur de transcription E2F nécessaires à la progression des cellules dans la phase S du cycle cellulaire (Figure 4). Cette inhibition active implique la formation de structures particulières d'hétérochromatine associées à l'induction du phénomène de sénescence, les SAHF (acronyme anglais pour Senescence Associated Heterochromatin Foci). Ces structures arborent des marqueurs caractéristiques de l'hétérochromatine hypercondensée et semblent être impliquées dans la répression de gènes nécessaires à la prolifération cellulaire, en particulier ceux régulés par le complexe répresseur RB1/E2F (Narita et al., 2003). Il a récemment été montré que ce complexe est recruté par un membre de la famille de protéines AGO, lui-même associé à un miRNA de la famille Let-7, ce dernier guidant le complexe jusqu'au promoteur de leurs cibles (Benhamed et al., 2012). Ce complexe bloque donc l'activité de la RNA Pol II et coopère avec des méthyltransférases et/ou histones déacétylases afin de verrouiller l'expression des gènes cibles de E2F.

L'importance de la voie de réponse aux dommages à l'ADN dans l'induction de la sénescence a été mise en évidence en inhibant l'expression de certains de ces composants. En effet, l'inactivation de la cascade de réponse aux dommages à l'ADN dans des cellules exprimant la forme oncogénique de la protéine RAS, permet aux cellules d'échapper à l'OIS facilitant par ce biais leur transformation néoplasique et le maintien d'une prolifération excessive (Chen et al., 2012; Land et al., 1983; Di Micco et al., 2006; Serrano et al., 1997).

Il est intéressant de noter que l'OIS peut également résulter de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs qui ont pour rôle de restreindre les effets prolifératifs des oncogènes (Chen et al., 2005; Courtois-Cox et al., 2006). Notons par exemple que la perte de la protéine PTEN ou de la protéine NF1, associée à l'activation respective des protéines AKT et RAS et





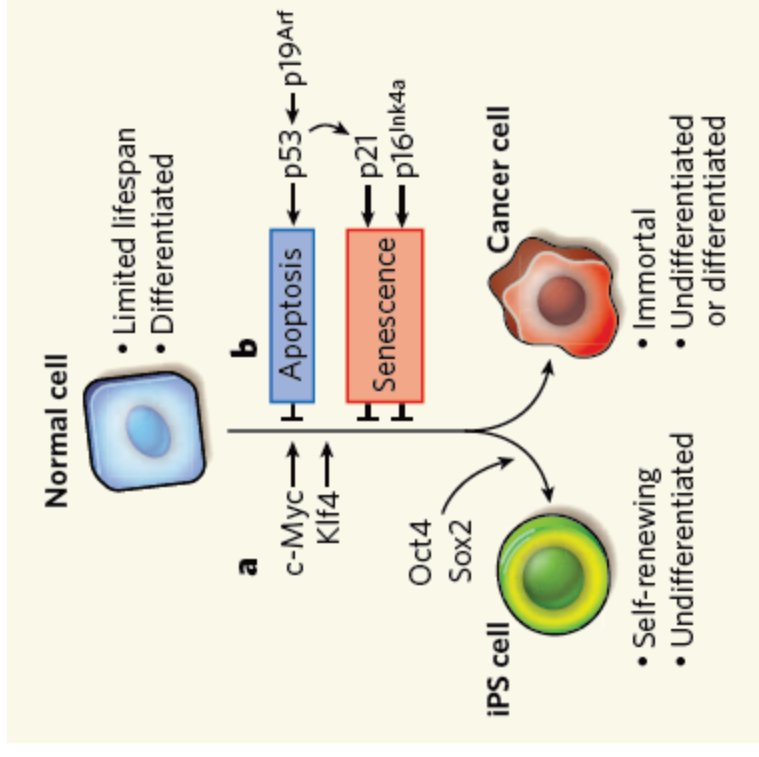
**Figure 4: Schématisation des voies impliquées dans l'induction du phénomène de sénescence oncogénique.**

L'induction d'un programme de sénescence joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et représente une barrière physiologique contre le développement tumoral. En réponse à une activation oncogénique ou un stress génotoxique, l'expression de différents acteurs clef des voies oncosuppressives dépendantes des voies p53 et Rb est induite. L'activation de ces voies conduit à un arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1.

impliquées l'une dans le développement de cancers de la prostate et l'autre dans celui de neurofibrome (Chen et al., 2005; Courtois-Cox et al., 2006). En cela, le stress oncogénique à l'origine de la sénescence peut donc soit être provoqué par une activation des oncoprotéines elles-mêmes, soit être une résultante de l'altération de fonctions de ces GST. En cela, qu'elle soit répllicative ou oncogénique, la sénescence induite par ces biais constitue donc une barrière puissante contre la prolifération des cellules (pré)-tumoraux.

De manière fortement intéressante, plusieurs travaux suggèrent également une relevance de la sénescence dans la régulation du pool de cellules souches pluripotentes induites. En effet, une série d'articles publiés dans *Nature* et *Genes and Development* en 2009 suggèrent pour la première fois que l'expression d'un oncogène, en l'occurrence c-Myc, et la sénescence en découlant, pourrait entraver ou tout du moins réduire l'efficacité de l'induction de cellules souches pluripotentes induites (iPS) (Banito et al., 2009; Hong et al., 2009; Li et al., 2009). L'induction de cette sénescence serait préférablement due au stress lié à la reprogrammation, plutôt que d'être le résultat direct d'une activation oncogénique sous forme d'OIS.

On pourrait donc faire l'hypothèse que les cellules souches cancéreuses soient issues d'un mécanisme de reprogrammation similaire et que leur établissement puisse être contrecarré par la sénescence oncogénique (Krizhanovsky and Lowe, 2009). En accord avec cette théorie, il a été montré que l'expression de p53 ou INK4a/ARF limitait la conversion de cellules primaires en cellules souches pluripotentes (Banito et al., 2009; Hong et al., 2009; Li et al., 2009). A l'inverse, une augmentation du taux de prolifération associée à une perte de p53 peut entraîner une accélération de la cinétique de formation d'iPS (Hanna et al., 2009). En cela, la sénescence pourrait non seulement inhiber la formation de la tumeur en limitant la prolifération des cellules anormales, mais elle pourrait aussi empêcher l'émergence de cellules souches initiatrices de tumeurs (Figure 5).



**Figure 5 : Les systèmes de sauvegarde cellulaire inhibent la reprogrammation nécessaire à la formation d'iPS.**

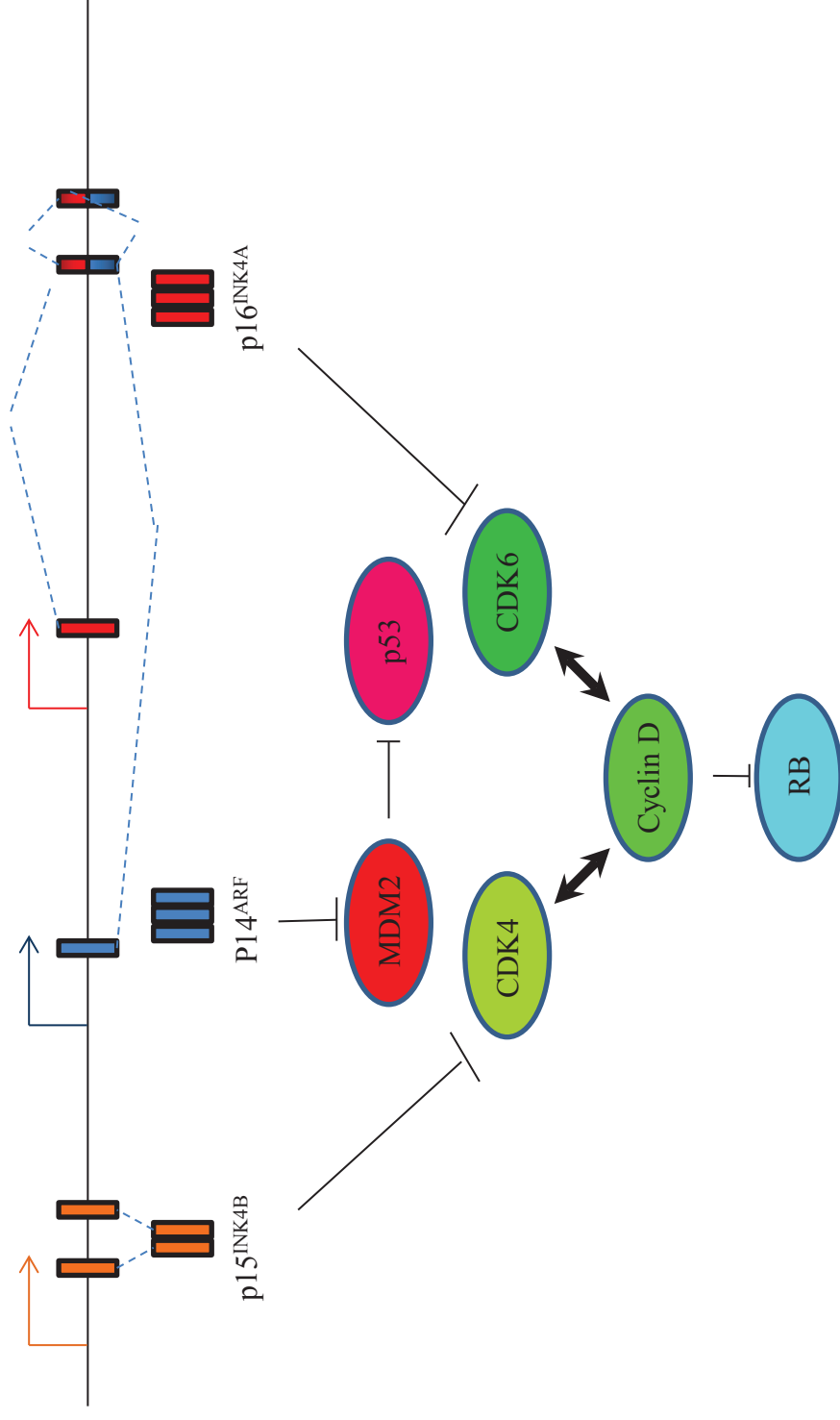
L'activation des voies oncosuppressives dépendantes des protéines RB et p53 diminuent de manière significative l'efficacité de production d'iPS à partir de cellules différenciées par le cocktail de protéines c-MYC, KLF4, OCT4 et SOX2. Par conséquent, les mécanismes de sauvegarde pourraient non seulement s'opposer à la transformation néoplasique des cellules mais également à la production de cellules souches cancéreuses.

Figure issue de Krizhanovsky V. et Lowe SW., *Nature* 2009.

### **I.5. Un focus sur le locus *INK4A/ARF/INK4B***

Le locus *INK4A/ARF/INK4B* code pour trois protéines oncosuppressives distinctes : la protéine ARF, p15<sup>INK4b</sup> (ensuite notée p15), et p16<sup>INK4a</sup> (ensuite notée p16) (pour revue voir: Gil and Peters, 2006; Kim and Sharpless, 2006). Ce locus de seulement 35 Kb est délété dans un large spectre de tumeurs. Alors que la protéine p15 résulte de la traduction d'un cadre de lecture spécifique, les protéines p16 et ARF sont les produits d'un épissage alternatif (Figure 6). Malgré deux exons sur trois en commun, les protéines sont codées avec des cadres de lecture différents. En conséquence, p16<sup>INK4a</sup> et ARF ne sont pas des isoformes et ne partagent donc aucune homologie de séquence. Au contraire, les protéines p15 et p16 partagent 80% d'homologie et arborent une redondance fonctionnelle (Kim and Sharpless, 2006). En effet, p16 n'étant pas encodé chez le poulet, p15 y joue un rôle majeur en termes d'induction de sénescence et son absence est primordiale pour l'immortalisation cellulaire (Kim et al., 2006). Cette constatation est en accord avec les rapports émanant d'études de modèles murins où l'expression d'*INK4b* est augmentée en réponse à la cascade de signalisation RAS-RAF-MEK et que sa perte rend les cellules plus sensibles à la transformation par RAS (Latres et al., 2000; Malumbres et al., 2000). Les protéines INK4 interagissent avec les cyclines kinases CDK4 et CDK6 et conduisent à un encombrement allostérique abolissant la fixation de ces kinases au cycline-D, inhibant ainsi la phosphorylation de Rb par CDK4/6. En cela, p15 et p16 maintiennent la protéine RB dans un état hypophosphorylé, séquestrant le facteur E2F, empêchant ainsi la fixation de ce dernier sur ses gènes cibles et donc un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Kim and Sharpless, 2006). La protéine ARF, pour sa part, fixe et inhibe la protéine MDM2, ce qui lève la répression de MDM2 sur p53. D'un point de vue mécanistique, il est supposé que MDM2 joue le rôle d'ubiquitine ligase E3. Sa liaison à p53 conduit à sa dégradation par le protéasome (Gil and Peters, 2006; Kim and Sharpless, 2006; Popov and Gil, 2010).

La surexpression du locus *INK4A/ARF/INK4B* dans des souris démontre le rôle anti-tumoral de ces gènes suppresseurs de tumeurs, sans pour autant favoriser leur vieillissement dû à l'induction prématurée du phénomène de sénescence, même si l'on observe une accumulation de p16 au cours du vieillissement chez les rongeurs et les humains (Hannun and Obeid, 2002; Janzen et al., 2006; Kim and Sharpless, 2006; Krishnamurthy et al., 2004; Matheu et al., 2004; Molofsky et al., 2006). Ces études ont également démontré que la délétion du locus *INK4A-ARF* dans les ilots



**Figure 6. : Organisation structurale du locus *INK4*.**

Des mécanismes d'épissage alternatifs et l'utilisation de promoteurs distincts permettent à partir d'un même gène de générer les deux protéines ARF et p16<sup>INK4A</sup>. Malgré deux exons sur trois en commun, les ARN sont traduits à partir de deux cadres de lecture différents. Les deux protéines ne présentent de fait aucune homologie de séquence. À l'inverse les protéines p15<sup>INK4B</sup> et p16<sup>INK4A</sup>, encodées par deux gènes distincts partagent 80% d'homologie et arborent une redondance fonctionnelle.

Figure adaptée de Kim WY. & Sharpless NE., *Cell* 2006.

pancréatiques, les cellules souches neuronales ainsi que dans les cellules souches hématopoïétiques, abroge partiellement le déclinement de prolifération en réponse à l'âge. De son côté, l'expression du gène *INK4B* ne semble pas être augmentée au cours du vieillissement (Krishnamurthy et al., 2004; Zindy et al., 1997).

A cause de leur redondance biologique supposée, la délétion combinée des locus *INK4A* et *INK4B* est suspectée d'être plus oncogénique que la simple délétion de l'un ou l'autre gène. Cela pourrait expliquer que l'on retrouve dans certains types de tumeurs (leucémie lymphoïde aigue, par exemple) une fréquence élevée de délétion 9p21 contenant le locus *INK4A/ARF/INK4B*, plutôt que de simples mutations/inactivations de ces gènes. En cela, la protéine p15 joue probablement un rôle anti-oncogénique important, notamment en absence de p16 (Krimpenfort et al., 2007). En revanche, il n'existe que peu d'études démontrant des délétions spécifiques du locus *INK4B* dans des échantillons de tumeurs (Herman et al., 1996; Uchida et al., 1997).

Divers stimuli peuvent induire l'expression des gènes *INK4A* et/ou *ARF*. Leur expression augmente notamment lors de dommages à l'ADN en réponse aux ultra-violets, aux espèces réactives de l'oxygène, aux radiations ionisantes et agents chimio-thérapeutiques ou encore aux dysfonctionnements télomériques (Chen et al., 2004; Jacobs and de Lange, 2004; Meng et al., 2003; Pavey et al., 1999). Il est toutefois important de noter que l'induction du gène *INK4A* survient deux à quatre semaines après observation des dommages à l'ADN (Jacobs and de Lange, 2004). Cette activation retardée en comparaison à l'activation très rapide de p53 suite à l'induction de dommages à l'ADN, peut expliquer l'ordre d'induction des gènes *INK4A* et *CIP1*, ce dernier étant une cible transcriptionnelle de p53, lors de l'entrée en sénescence de fibroblastes humains après leur passage en série *in vitro*. En effet, l'expression de la protéine p21<sup>CIP1</sup> (p21) précède celle de p16 de plusieurs semaines. Étonnamment, l'expression des deux inhibiteurs est rarement induite dans une même cellule (Herbig et al., 2004; Kim and Sharpless, 2006; Stein et al., 1999). De plus, le taux d'induction de *CIP1* en réponse à des dommages à l'ADN se fait indépendamment du statut du gène *INK4A* dans la cellule. La réciproque est vraie pour le taux de protéine p16. Ces données sont donc difficilement conciliables avec un modèle où la modulation du taux de protéines p21 et p16 réponde au même signal initial. En cela, il faut voir l'induction de *CIP1* et *INK4A* comme des événements indépendants, l'augmentation de l'expression de l'un n'empêchant aucunement la cellule de répondre ultérieurement à un signal influant sur l'autre voie. En comparaison, la régulation du gène *INK4B* en réponse aux agents génotoxiques n'est que

très peu étudiée. On observe, néanmoins, une expression accrue en réponse au TGF- $\beta$  ainsi que dans quelques modèles de sénescence oncogénique liée à l'activation constitutive de la protéine RAS (Collado et al., 2005; Reynisdóttir et al., 1995).

## **II. L'apoptose.**

L'apoptose est définie comme étant une mort cellulaire programmée, qui participe à divers aspects de la physiologie. D'abord observée au cours de la métamorphose des amphibiens (Vogt C., 1842), l'apoptose a rapidement été mise en évidence comme se produisant dans de nombreux tissus en voie de développement dans les invertébrés et les vertébrés (Clarke and Clarke, 1996; Glucksmann, 1951). Le terme de « mort cellulaire programmée » a été initialement utilisé pour décrire les morts cellulaires se produisant au niveau de structures anatomiques particulières, à des moments précis au cours du développement soulignant le fait que cette mort fait partie intégrante du déterminisme de l'embryogenèse (Lockshin, R.A., and Williams, 1964). L'apoptose n'est pas seulement essentielle pour le développement, elle rentre également en compte dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte : l'involution de la glande mammaire après la période d'allaitement (Li et al., 1997; Watson, 2006) ou encore la régulation de la réponse immune lors de l'élimination des lymphocytes T après la maîtrise d'une infection (Razvi et al., 1995). La dérégulation de l'apoptose est connue pour entraîner diverses pathologies. En excès, elle peut conduire à certaines pathologies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson) et immunitaires (syndrome d'immunodéficience acquise) alors qu'un déficit peut être à l'origine de maladies auto-immunes (Mountz et al., 1996; Rieux-Laucat et al., 2003) et de la cancérogenèse. L'apoptose se traduit par de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques. On observe tout d'abord un rétrécissement cellulaire dû à une condensation du cytoplasme en réponse à une déshydratation de la cellule ainsi qu'à une condensation de la chromatine présente dans le noyau. S'en suit une dégradation caractéristique de l'ADN en « barreaux d'échelles » par l'endonucléase CAD/DFF40 (Samejima et al., 2001). Ce processus aboutit à la formation de corps apoptotiques. Il est important de noter qu'au cours de ces nombreuses modifications, l'intégrité membranaire est maintenue. On observe cependant un bourgeonnement de la membrane plasmidique associé à la perte de l'asymétrie des phospholipides membranaires. En effet, les phosphatidylsérines, normalement présentes dans le feuillet intracellulaire de la

membrane, se trouvent externalisées à la surface des cellules. Ce mécanisme constitue un signal conduisant à la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. Cette élimination associée au maintien de l'intégrité membranaire permet, contrairement à la nécrose, de limiter le relargage de molécules pro-inflammatoires, limitant ainsi les impacts néfastes sur les tissus environnants (Savill et al., 1989).

Le mécanisme d'apoptose est régi par deux voies de signalisation principales : intrinsèque, impliquant la mitochondrie, et extrinsèque impliquant la super-famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor). La finalité de ces deux voies est l'activation d'endoprotéases spécifiques, les caspases.

### **II.1. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale.**

Cette voie, activée en réponse à divers stimuli dont l'activation d'oncogènes, les dommages à l'ADN, la privation en facteurs de survie, est régulée par les protéines de la famille BCL-2. Cette grande famille est constituée de trois sous-classes arborant des activités différentes voire antagonistes :

- Les protéines dotées de propriétés anti-apoptotiques comme les protéines BCL-2, BCL-xL et MCL-1.
- Les protéines dotées de propriétés pro-apoptotiques à multidomaines comme la protéine BAX et BAD.
- Les pro-apoptotiques BH3-only comme la protéine PUMA.

La voie mitochondriale est contrôlée par un équilibre complexe entre facteurs pro- et anti-apoptotiques. Lors d'un stress, l'activation des membres pro-apoptotiques se traduit par une augmentation de la perméabilité de la membrane externe de l'enveloppe mitochondriale. Celle-ci est l'évènement clef qui engage irréversiblement les cellules vers l'apoptose. Elle s'accompagne d'une chute du potentiel membranaire et résulte de la formation de pores ou canaux membranaires. La conséquence de cette perméabilité est la libération dans le cytoplasme de facteurs apoptogènes solubles précédemment séquestrés dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Les deux principaux facteurs libérés sont le cytochrome C ainsi que le complexe protéique SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with lowpI). Une fois libéré, le cytochrome C se lie à la protéine

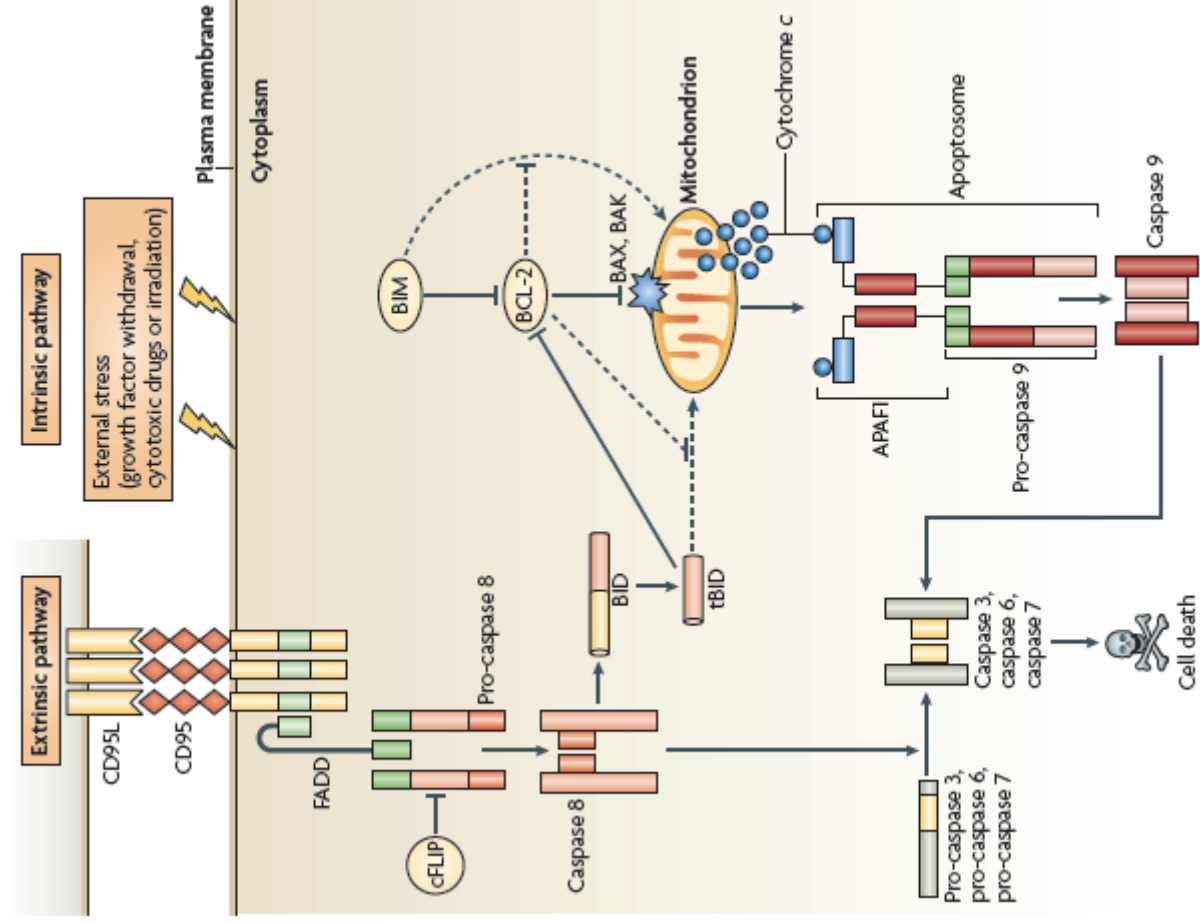


APAF-1 ainsi qu'à la pro-caspase 9, formant ainsi une structure appelée apoptosome, permettant le clivage du zymogène et la formation de la caspase 9 mature. Cette caspase dite initiateur, va par la suite induire le clivage et la maturation de caspases effectrices telles que la caspase 3 permettant, en cela, la protéolyse des structures cellulaires. De son côté, SMAC/DIABLO permet l'inhibition des protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) qui sont-elles mêmes impliquées dans l'inhibition des caspases effectrices de la voie mitochondriale.

## **II.2. La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.**

Cette voie est activée à la suite de l'activation de récepteurs de mort (FAS, TNFR1), situés à la surface de la cellule, par leur ligand. Les récepteurs de mort font partie de la super-famille des récepteurs au TNF. Ils sont caractérisés par la présence d'un domaine intracellulaire hautement conservé appelé DD (Death Domain ou domaine de mort). Ce domaine est à la base de la transduction du signal vers les voies de signalisation intracellulaires. L'interaction entre le récepteur FAS et son ligand, FAS-L, entraîne l'oligomérisation du récepteur induisant la formation du complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex). La formation de ce complexe correspond au recrutement, au niveau cytoplasmique du récepteur, de protéines adaptatrices FADD via leur domaine de mort. La transduction du signal via le récepteur au TNF conduit également à la formation d'un complexe par l'intermédiaire des protéines adaptatrices TRADD. La présence sur ces protéines adaptatrices (FADD et TRADD) d'un second domaine dit DED (Death Effector Domain) permet la mobilisation de la pro-caspase 8 au niveau du complexe. Le rapprochement de plusieurs entités de pro-caspase 8 permet leur clivage réciproque et la libération de caspase 8 mature qui pourra activer les caspases effectrices. Dans certaines cellules cependant, l'efficacité de formation du complexe DISC étant faible, la caspase 8 peut interagir avec la voie intrinsèque en clivant le facteur pro-apoptotique BH3-only BID, conduisant alors malgré tout à une réponse apoptotique complète (Figure 7).

Il n'est, à l'heure actuelle, pas clairement établi ce qui détermine le « choix » entre l'apoptose et la sénescence. Bien que la majorité des cellules soient capables d'induire les deux mécanismes, ces systèmes de sauvegardes semblent mutuellement exclusifs (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Childs et al., 2014). Le contexte et/ou le type cellulaire semble être des facteurs déterminants (Seluanov et al., 2001). En outre, il a été rapporté que les manipulations des



**Figure 7:** Description des voies de régulation de l'apoptose intrinsèques et extrinsèques.

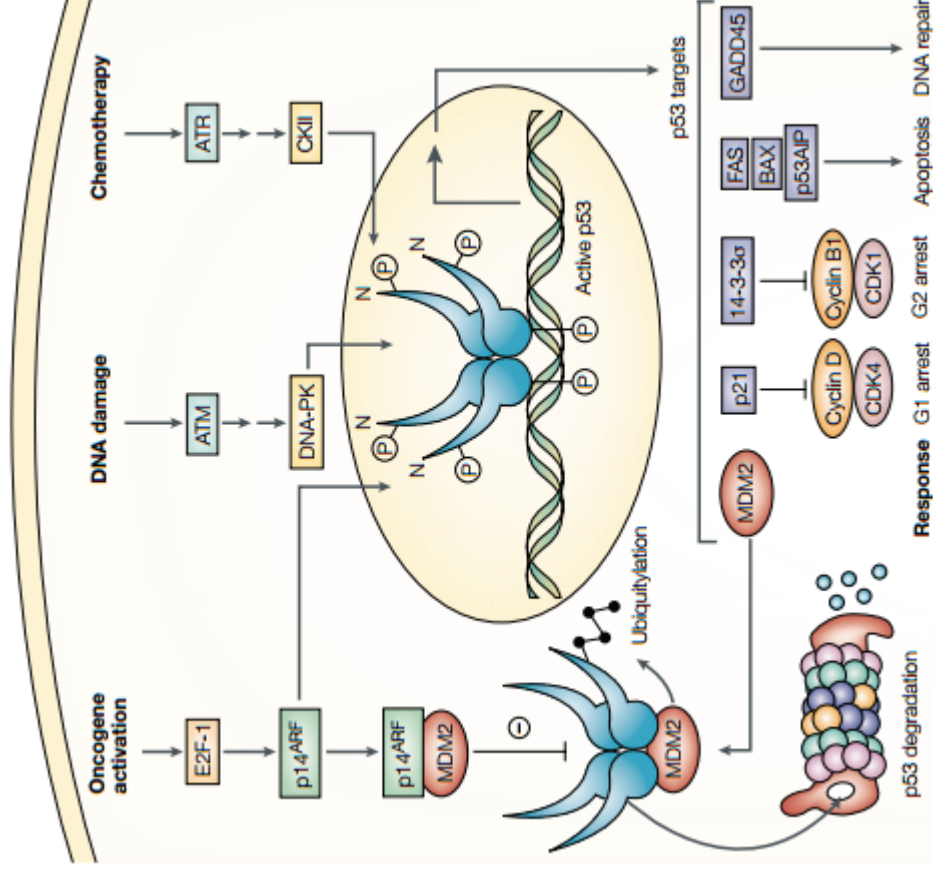
Figure issue de Bouillet P. & O'Reilly LA., Nat. Rev. Immunol. 2009.

niveaux de BCL-2 ou l'inhibition de l'expression de la caspase 3 conduisent à l'entrée en sénescence de cellules généralement prônant à l'apoptose (Nelyudova et al., 2007; Rebbaa et al., 2003). Ces données indiquent clairement qu'il existe une diaphonie entre les voies de signalisation régissant les processus d'apoptose et de sénescence cellulaire, notamment par l'intermédiaire de la protéine p53 (Figure 8).

### **III. Mécanismes d'échappement à la sénescence et l'apoptose**

La dérégulation des processus d'apoptose et de sénescence a été décrite comme étant à l'origine de plusieurs pathologies humaines, notamment le cancer. Dans les cellules humaines, il semblerait que l'inhibition concomitante des voies p53 et RB soit nécessaire à un échappement de la sénescence en réponse à une activation mitogénique (Haferkamp et al., 2009; Mallette et al., 2007). Dans certaines études, cependant, l'inactivation expérimentales de la voie p53 (Di Micco et al., 2006; Voorhoeve and Agami, 2003) ou de la voie RB seule (Drayton et al., 2003; Narita et al., 2003) conduit à cet échappement. Cela peut s'expliquer par la forte proportion de mutations de l'une ou l'autre de ces voies dans les lignées tumorales utilisées en culture cellulaire, l'inactivation de la voie subsistante suffisant donc à l'induction du phénotype. En effet, de nombreuses altérations des mécanismes présentés précédemment ou touchant les voies en amont (MDM2, p16 entre autres) ont été décrites dans les cellules cancéreuses. C'est le cas, par exemple, de la protéine oncosuppressive p53 qui voit son activité perturbée de diverses manières. La perte de fonction de p53, que ce soit suite à une altération de la protéine ou par le biais de mécanismes d'inactivation fonctionnelle, conduit à une altération du processus apoptotique et semble être un évènement commun à plusieurs cancers.

Plus de 75% des mutations conduisent à l'expression d'une protéine p53 ayant perdu ses fonctions oncosuppressives et pouvant dans le même temps exercer un effet dominant négatif sur le pool de protéines non-mutées. Cette activité transdominante négative résulte de leur aptitude à se tétramériser avec la protéine sauvage tout en ayant perdu leur capacité à se fixer sur l'ADN, générant ainsi des complexes transcriptionnels inactifs. De plus, certains mutants de p53 acquièrent également des fonctions oncogéniques propres. Les premières observations en faveur de cette hypothèse vinrent d'expériences de transfection de mutants de p53 dans des cellules p53<sup>-</sup>



**Figure 8 :** *La protéine p53 est cœur d'un réseau transcriptionnel impliqué dans l'induction des phénomènes de sénescence et/ou d'apoptose.*

Divers stress (activation oncogénique, génotoxique ou encore dommages à l'ADN de manière plus générale) conduisent à l'activation du gène *TP53* au travers de diverses voies telles que celle des kinases ATM/ATR ou l'induction du gène *ARF*. En phosphorylant les extrémités N-terminales de la protéine p53 reconnues par la protéine MDM2 ou en séquestrant MDM2 respectivement, ces deux voies coopèrent dans la stabilisation de la protéine p53. L'induction conséquente des gènes cibles de p53 favorise soit l'arrêt du cycle et la réparation des dommages soit l'engagement des cellules en apoptose, selon l'intensité du signal d'activation de la protéine oncosuppressive.

<sup>1/</sup>. De manière fort intéressante, ces cellules démontrèrent une augmentation de leur capacité à former des tumeurs en xénogreffes (Shaulsky et al., 1991; Wolf et al., 1984). Il existe plusieurs propriétés pouvant expliquer ce type de résultats. En effet, plusieurs études ont démontré un gain de prolifération suite à l'expression de formes mutantes de la protéine p53 (Chen et al., 1994). Parallèlement, certains mutants induisent une altération des points de contrôle du fuseau mitotique conduisant à des instabilités chromosomiques (Gualberto et al., 1998; Wang et al., 1998b).

Les mutations de p53 ont enfin été démontrées comme favorisant la dissémination métastatique en promouvant l'EMT (Kogan-Sakin et al., 2011). Une première explication de ce gain de fonction a été apporté en montrant une stabilisation de la protéine SNAIL2 par les protéines p53 mutées (Wang et al., 2009).

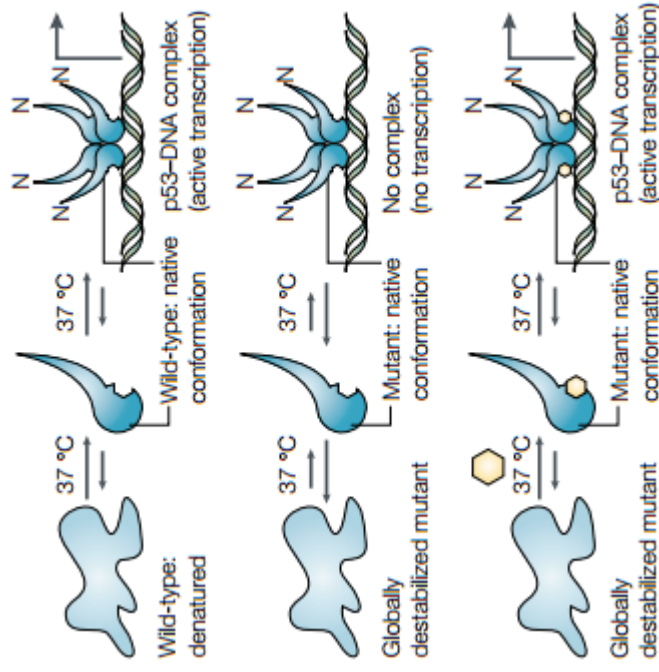
#### **IV. Restauration des mécanismes de sauvegardes comme approches thérapeutique**

Comme décrit préalablement, plusieurs études ont démontré que la réactivation de p53 *in vivo* dans des tumeurs est suffisante, dans ces modèles simplifiés, pour réactiver les programmes de sénescence ou d'apoptose selon le contexte cellulaire, conduisant à la régression de la tumeur (Dankort et al., 2007; Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). Ainsi l'un des axes thérapeutiques développés vise à restaurer la fonction de la protéine oncosuppressive p53. Ce gène, découvert il y a maintenant 35 ans, se trouve être le gène le plus muté dans les cancers humains avec une fréquence de mutation d'environ 50%.

95% de ces mutations se situent dans le domaine de liaison à l'ADN de la protéine, inhibant ainsi son activité transcriptionnelle. Ces mutations ponctuelles se répartissent en deux grandes catégories, celles dites de contact et structurelles. Les mutations de contact concernent des acides aminés situés à l'interface avec l'ADN et altèrent l'activité de transcription sans pour autant perturber la structure tridimensionnelle de la protéine. En revanche, les mutations dites structurelles déstabilisent les domaines centraux ou la protéine dans sa totalité (Bullock and Fersht, 2001).

La protéine p53 est instable avec une température de fusion de 44°C et une demi-vie relativement courte de neuf minutes à 37°C. C'est la raison pour laquelle, il existe un intérêt particulier à élaborer des peptides et autres molécules de faible poids moléculaire permettant de stabiliser la protéine mutante dans sa conformation proche de la protéine sauvage et ainsi restaurer, ne serait-ce que partiellement, l'activité de la protéine (Bullock and Fersht, 2001). En effet, l'augmentation de la température de fusion du complexe mutant-peptide, conduit à l'élévation de l'enthalpie requise pour dénaturer la protéine ainsi que le renforcement de l'interaction entre la protéine et sa cible, notamment l'ADN. Des études pionnières ont démontré l'efficacité de peptides synthétiques dérivés du domaine C-terminal ou encore celle d'anticorps ciblant cette région. Ces deux approches ont permis de restaurer le potentiel de fixation à l'ADN à la fois de mutants de contact et de mutants structurellement altérés (Hupp et al., 1995; Selivanova et al., 1997) et de restaurer, par exemple, une activité pro-apoptotique dans des lignées cancéreuses mammaires (Figure 9) (Kim et al., 1999; Selivanova et al., 1997). Malgré l'abondance de travaux dédiés à l'identification de stratégies visant à restaurer une activité sauvage des mutants de p53, il existe encore certaines incertitudes quant à la stabilité et le transport intracellulaire de ces peptides, des points importants à adresser avant leur utilisation en essais cliniques (Brown et al., 2009; Bykov et al., 2002; Foster et al., 1999; Wiman, 2010).

Au-delà du ciblage des mutants de p53, d'autres études s'intéressent à l'inactivation de la voie de signalisation ou de protéines effectrices de la protéine oncosuppressive. Les protéines MDM2 et MDM4 font parties des principaux régulateurs de l'activité de p53. Dans des conditions physiologiques, ces protéines se lient à p53 afin de l'ubiquitiner et ainsi conduire à sa dégradation par le protéasome. Dans des conditions de stress, la fonction des protéines MDM2/4 est bloquée par phosphorylation, titration ou encore augmentation de leur dégradation, conduisant à une stabilisation de p53. Dans de nombreuses tumeurs, une amplification du gène *MDM2* ou l'inhibition du gène *ARF*, conduisent à une augmentation de l'activité de la protéine MDM2 et la dégradation consécutive de la protéine p53 (Brown et al., 2009; Oliner et al., 1992). Il existe une multitude d'études ayant été menées afin d'identifier des inhibiteurs de MDM2 (nutline, benzodiazépine, spiro-indole, MI-219, RITA,...) (Brown et al., 2009, 2011; Lu et al., 2014; Vassilev et al., 2004; Wiman, 2010). Cependant, les molécules actuelles ne possèdent pas d'activité significative envers MDM4. En effet, les protéines MDM2 et MDM4 possèdent des mécanismes distincts d'inactivation de la protéine p53. La déficience de l'une ou l'autre des



**Figure 9 : Restauration de l'activité de la protéine p53.**

La protéine p53 est fréquemment mutée au sein des cellules tumorales. Ces mutations altèrent notamment la capacité de la protéine à se tétramériser, à adopter une conformation structurale correcte ou encore atténue son affinité pour ses séquences cibles. Il existe donc un intérêt particulier à élaborer des peptides et autres molécules de faible poids moléculaire permettant de stabiliser la protéine mutante dans une conformation proche de la protéine sauvage et ainsi restaurer, ne serait-ce que partiellement, l'activité de la protéine.

Figure issue de Bullock N. & Fersht AR., *Nat. Rev. Cancer* 2001.



protéines conduit à une létalité embryonnaire confortant l'idée qu'elles aient des fonctions distinctes (Parant et al., 2001). Les deux protéines fixent, pour autant, la protéine p53 par l'intermédiaire d'une même séquence, ce qui fait de cette région une cible de choix pour l'inactivation des deux homologues (Pazgier et al., 2009). Au-delà de ces quelques exemples, il est évident que n'importe quelle composante de la voie oncosuppressive dépendante de p53 peut être touchée, multipliant ainsi la complexité des stratégies visant à restaurer la fonctionnalité de cette voie.

Bien que la plupart des études se concentrent sur des stratégies conduisant à l'induction de l'apoptose, d'autres options comprenant l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'induction de la sénescence cellulaire, ou encore la réactivation de programme de différenciation (de sorte que les cellules subissent une différenciation terminale et donc un arrêt de la prolifération) sont envisageables. En cela, des études similaires à celles réalisées sur p53 ont été menées sur la protéine RB. En effet, dans des modèles transgéniques murins *Rb1<sup>-/-</sup>* et *TP53* muté, ayant développé des tumeurs basal-like enrichies en marqueurs de l'EMT, la réexpression de la protéine RB1 conduit à leur régression. Ces tumeurs nécessitent donc le maintien de l'inhibition de la protéine oncosuppressive RB, ce qui indique que malgré leurs propriétés agressives, le phénotype tumorigénique peut être contrarié, notamment par des stratégies visant à restaurer l'activité de la protéine RB sauvage (Jiang et al., 2011; Knudsen and Wang, 2010). Malgré les difficultés pharmacologiques liées à la réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, des approches de thérapies géniques ciblant spécifiquement la voie RB ont été déployées dans des modèles précliniques (Roig et al., 2004; Zhang et al., 2003). Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de cyclines kinases empêchant la phosphorylation de la protéine RB, maintenant donc la répression transcriptionnelle associée est également envisagée. Parmi ces agents, le composé Pfizer PD-0332991 représente la première utilisation ciblée d'un agent activant spécifiquement la voie RB en clinique (essai clinique de phase I) (Fry et al., 2004) et prévient la progression pathologique de patients atteints de tératome pendant une période de deux ans (Vaughn et al., 2009).

En outre, plusieurs essais cliniques ont démontré l'efficacité de l'utilisation de stratégies cytostatiques qui limitent la prolifération des cellules tumorales sans néanmoins induire de mort cellulaire (Desai and Stadler, 2006; Martin and Schilder, 2006). Ces approches peuvent fournir



un nouvel arsenal thérapeutique aux effets secondaires réduits pour une survie équivalente du patient et correspondre à un objectif plus réaliste pour la prise en charge chronique de certains cancers. Une des options les plus étudiées pour l'induction de cette cytotase est la sénescence induite par des agents thérapeutiques (SIT). Le phénomène de SIT a été identifié dans des échantillons tumoraux issus de patients ayant subi des traitements génotoxiques ou radiations selon les protocoles thérapeutiques classiques (te Poele et al., 2002). La réponse cytotatique ou génotoxique dépend non seulement du contexte cellulaire mais également de la dose à laquelle la thérapie est prescrite. (Chang et al., 1999a; Zheng et al., 2004). A titre d'exemple, des lignées tumorales prostatiques traitées par 250 nM de doxorubicine entrent en apoptose alors qu'une dose de 25 nM du même agent thérapeutique induit de la sénescence (Ewald et al., 2009; Schwarze et al., 2005). En outre, il semble que la SIT puisse fonctionner comme un soutien de la réponse au traitement dans les cellules cancéreuses dans lesquelles les voies apoptotiques sont désactivées (Schmitt et al., 2002; Zheng et al., 2004). Notons que lors de l'utilisation de certains médicaments ou stratégies thérapeutiques induisant de la sénescence, la mise en place de la SIT peut prendre plusieurs jours, contrairement à l'activation rapide des processus apoptotiques qui conduisent à une destruction dans les premières 24 heures (Chang et al., 1999b; Schwarze et al., 2005). Bien que des contraintes similaires puissent induire aussi bien de l'apoptose que de la sénescence, les voies régissant ces processus divergent et leur régulation est distincte. L'identification et la caractérisation de ce point nodal et des voies impliquées sont donc cruciales pour une meilleure compréhension de la SIT. De manière étonnante et contrairement à ce qui a été décrit dans le paragraphe précédent, les voies classiques impliquées dans la sénescence (p53, RB) semblent, dans certains cas, ne pas être nécessaires à l'induction du phénomène de SIT (Schmitt et al., 2002). Cette donnée apporte une explication rationnelle à l'induction de la SIT dans des lignées cancéreuses mutées pour les gènes *RBI* et *TP53* (Chang et al., 1999a, 1999b). La nature des effecteurs impliqués reste à définir. Quoi qu'il en soit, un nombre croissant d'études confirme l'induction du phénomène de sénescence dans des lignées tumorales après divers traitements classiquement utilisés en clinique tels que le cisplatine (Wang et al., 1998a), la doxorubicine (Elmore et al., 2002; te Poele et al., 2002), la camptothécine (Han et al., 2002) et l'hydroxyurée (Park et al., 2000). Ces travaux complètent parfaitement les stratégies visant à identifier des molécules capables de réactiver les fonctions oncosuppressives des voies Rb et p53.

## **2ème partie : La transition épithélio-mésenchymateuse.**

## **I. Quelques notions sur la transition épithélio-mésenchymateuse**

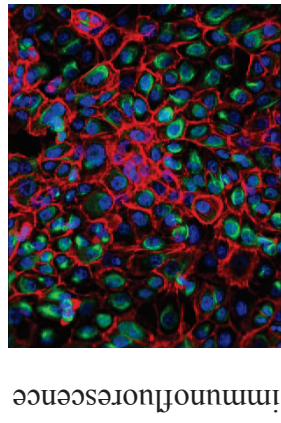
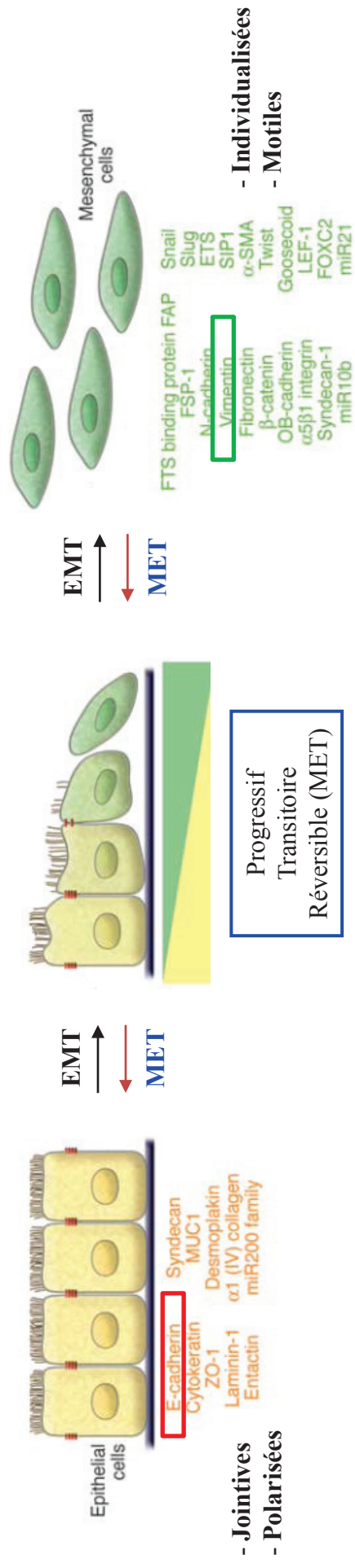
La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, selon l'acronyme anglais) est un mécanisme de transdifférenciation permettant de convertir de manière transitoire, et donc par définition réversible, des cellules épithéliales polarisées et jointives en cellules mésenchymateuses individualisées et motiles (Figure 10). De par sa capacité à favoriser la migration cellulaire, l'EMT joue un rôle prépondérant au cours des mouvements morphogénétiques et la mise en place de différentes entités anatomiques de l'embryon (valves cardiaques, voûte palatine, paroi du tube digestif, crête neurale) (Thiery et al., 2009). En effet, l'EMT intervient dès l'implantation de l'embryon dans l'utérus lorsque des cellules trophoctodermes s'infiltrant au niveau de l'endomètre pour donner naissance à certaines annexes embryonnaires telles que le placenta (Larue et al., 1994). Après la nidation, une des étapes essentielles du développement embryonnaire au cours duquel l'EMT joue un rôle prépondérant est la gastrulation (Trelstad et al., 1967). Cette étape correspond à la mise en place des trois feuillets embryonnaires fondamentaux que sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme à partir du feuillet embryonnaire primitif, l'épiblaste. Au niveau de la ligne primitive, structure délimitant l'axe antéro-postérieur de l'embryon, des cellules de l'épiblaste vont s'invaginer puis subir une EMT. Localement, la membrane basale va se rompre et permettre la migration des cellules dans la matrice située sous l'épiblaste pour conduire à la formation du mésoderme et de l'endoderme. L'épiblaste se différencie par la suite afin de donner naissance à l'ectoderme. C'est en réalisant plusieurs cycles d'EMT et de MET (MET ; acronyme anglais de mesenchymal to epithelial transition ; processus inverse de l'EMT) que le mésoderme et l'endoderme vont former de nombreux tissus et organes, parmi lesquels se trouvent le cœur et les parois du tractus digestif (Figure 11).

Après la gastrulation chez les vertébrés, le territoire de l'épiderme et celui du tissu neuronal sont progressivement définis le long de l'axe rostrocaudal. A la frontière entre ces deux territoires se forme une structure embryonnaire spécifique des vertébrés, la plaque neurale. De façon similaire au phénomène observé au niveau de l'épiblaste, certaines cellules de la plaque neurale subissent une EMT au sein de l'épithélium neural dorsal et forment la crête neurale. La crête neurale, précurseur de l'encéphale et de la médulla, renferme une population de cellules

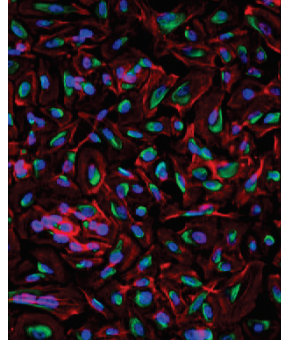
## Phénotype et marqueurs épithéliaux

## Phénotype intermédiaire rendant compte de la plasticité allouée à ces cellules

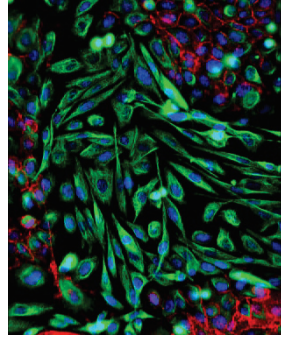
## Phénotype et marqueurs mésenchymateux



E-Cadhérine  
Vimentine  
Dapi



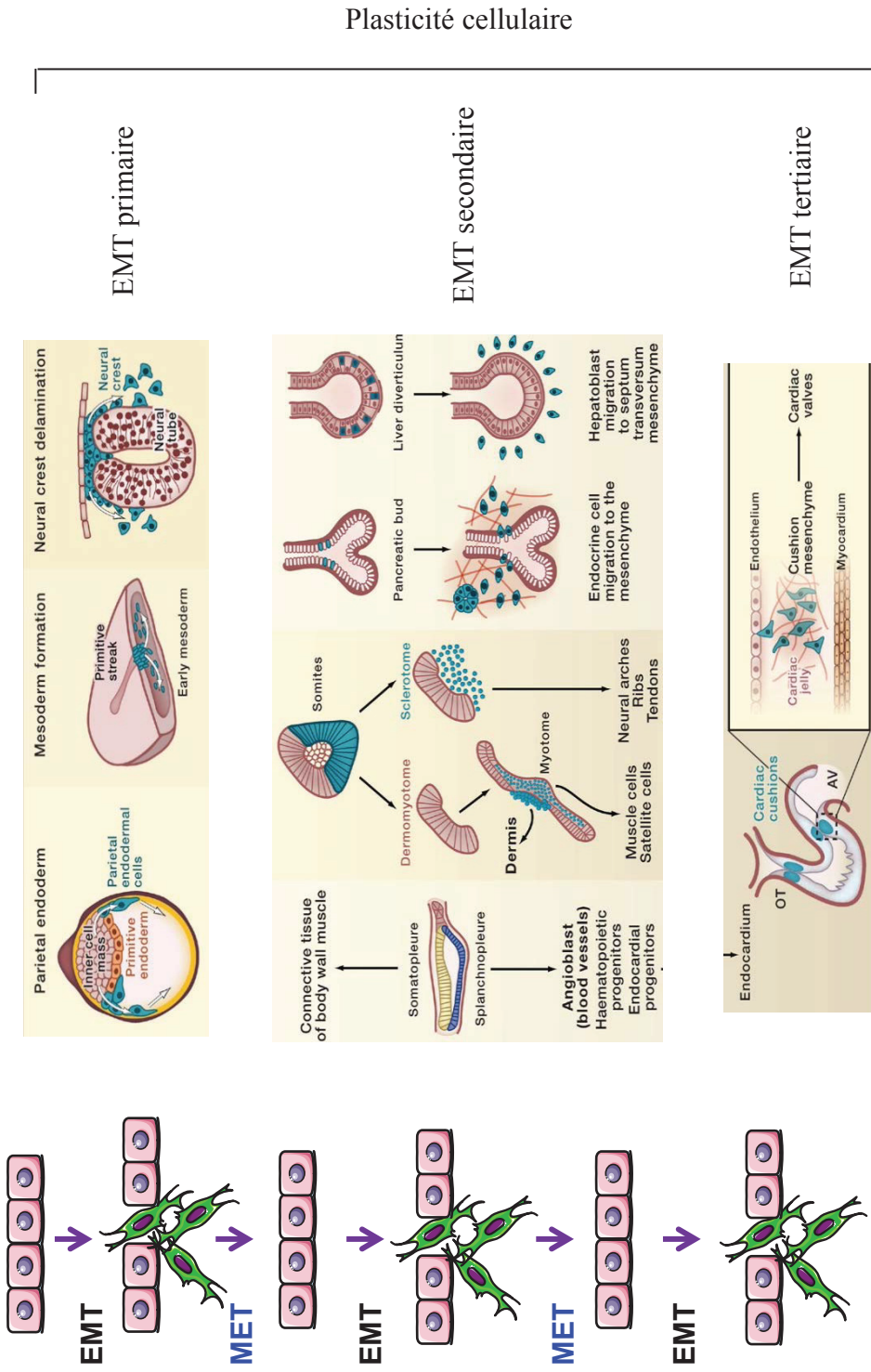
Progressif  
Transitoire  
Réversible (MET)



**Figure 10 :** La transition épithélio-mésenchymateuse, un mécanisme de transdifférenciation cellulaire.

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) permet la conversion de cellules épithéliales polarisées et jointives en cellules mésenchymateuses individuelles et motiles. Ce mécanisme de transdifférenciation joue un rôle clef dans la morphogénèse et l'organogénèse au cours du développement embryonnaire. Il est réactivé de manière aberrante dans différentes conditions pathologiques telles la fibrose et la progression tumorale.

Figure adaptée de Kalluri R. & Weinberg R.A., *J. Clin. Invest.* 2009



**Figure 11: EMT et embryogenèse.**

De par sa capacité à favoriser la migration cellulaire, l'EMT joue un rôle prépondérant au cours des mouvements morphogénétiques et la mise en place de différentes entités anatomiques de l'embryon. L'organogenèse nécessite en réalité plusieurs cycles d'EMT et de MET afin d'élaborer, à partir des structures existantes, les groupements tissulaires définitifs (valves cardiaques, voûte palatine, paroi du tube digestif, crête neurale). En cela, l'altération de ce processus engendre, dans la plupart des cas, de sévères défauts phénotypiques.

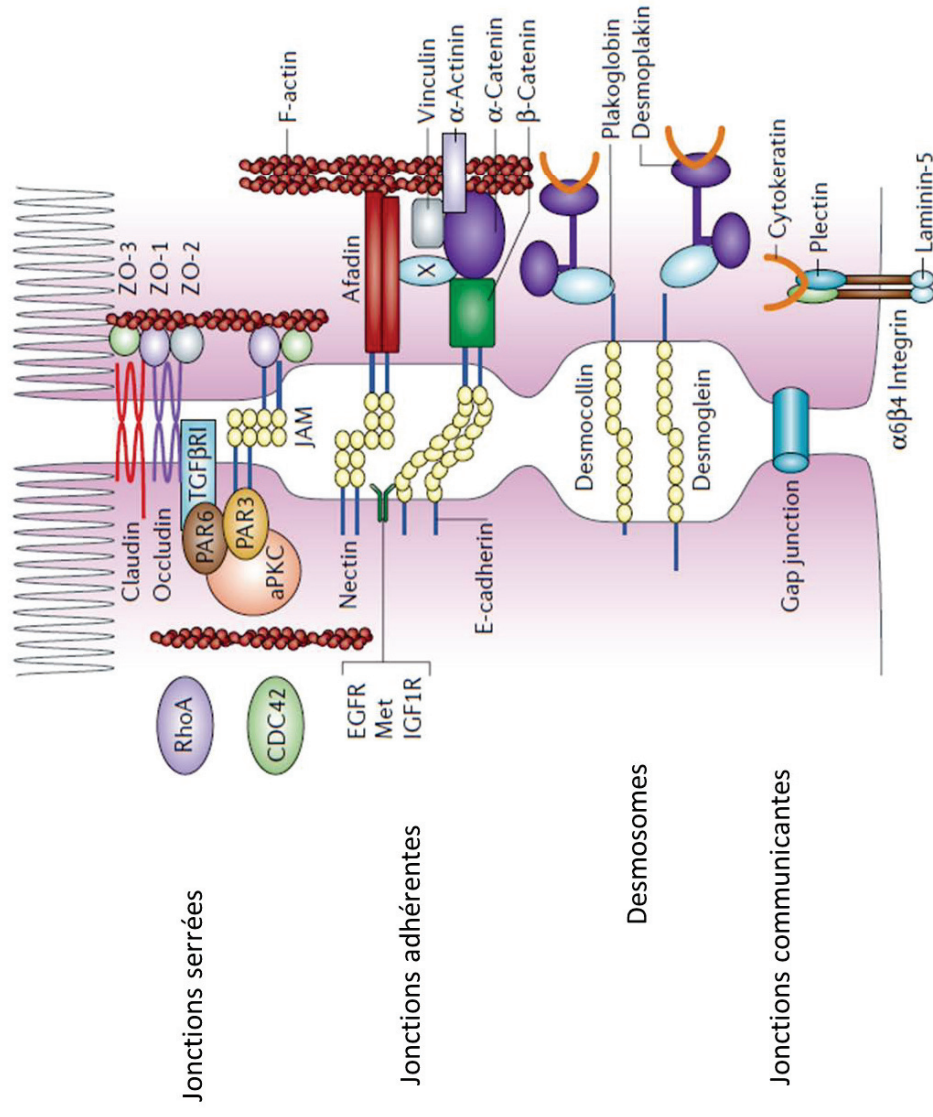
Figure adaptée de Thiery J-P. et al., *Cell* 2009.

pluripotentes qui seront à l'origine du système nerveux périphérique, des structures cranio-faciales telles que la mandibule, les odontoblastes ainsi que du tissu osseux et des mélanocytes (Acloque et al., 2009; Nieto, 2001).

Les cellules épithéliales présentent pour caractéristiques d'être juxtaposées et solidarisées par des systèmes de jonctions intercellulaires, tels que les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes (Figure 12). Ces structures membranaires spécialisées permettent le maintien de la cohésion et de l'orientation des cellules. L'association des jonctions intercellulaires et l'ancrage des cellules à la lame basale confèrent aux épithelia une grande résistance au stress mécanique et leur permet de jouer leur rôle de barrière physiologique de l'organisme. La reprogrammation génétique et épigénétique que représente l'EMT se traduit par une perte d'expression de nombreuses protéines impliquées dans ces jonctions intercellulaires. En particulier, la perte d'expression de l'E-cadhérine constitue un événement suffisant pour induire une EMT *in vitro*, tout du moins dans certains modèles expérimentaux (Onder et al., 2008). L'EMT s'accompagne également d'une restructuration du cytosquelette associée à l'induction de l'expression de nouveaux filaments intermédiaires comme la vimentine et à celle d'autres marqueurs telle que la N-cadhérine. Cette restructuration contribue en particulier à l'acquisition d'une motilité, accentuée par l'expression de protéines telles la fibronectine et les métalloprotéases capables de modifier la matrice extracellulaire.

De nombreuses voies de signalisation (TGF- $\beta$ , Wnt, TNF- $\alpha$ , Notch) sont impliquées dans la régulation de l'EMT. Ces voies influent à différents niveaux sur le mécanisme de transdifférenciation, inhibant ou activant des programmes géniques spécifiques. Elles sont souvent interconnectées et partiellement redondantes, ce qui fait de l'EMT un mécanisme cellulaire complexe (Figure 13) (Moustakas and Heldin, 2007; Thiery et al., 2009). La variabilité observée d'un modèle cellulaire à l'autre est généralement le résultat de l'expression différentielle de récepteurs et/ou d'effecteurs de ces voies de signalisation. Toutes ces voies, directement ou indirectement, aboutissent *in fine* à l'activation de facteurs de transcription embryonnaires, régulateurs clefs de l'EMT. L'inter-régulation existante des facteurs de transcription embryonnaires (notés FTE dans la suite du manuscrit), ainsi que la présence de boucles de rétrocontrôle impliquant des miRNA, complexifient encore davantage la régulation du mécanisme cellulaire (Figure 14). Les variations existantes dans ces réseaux transcriptionnels

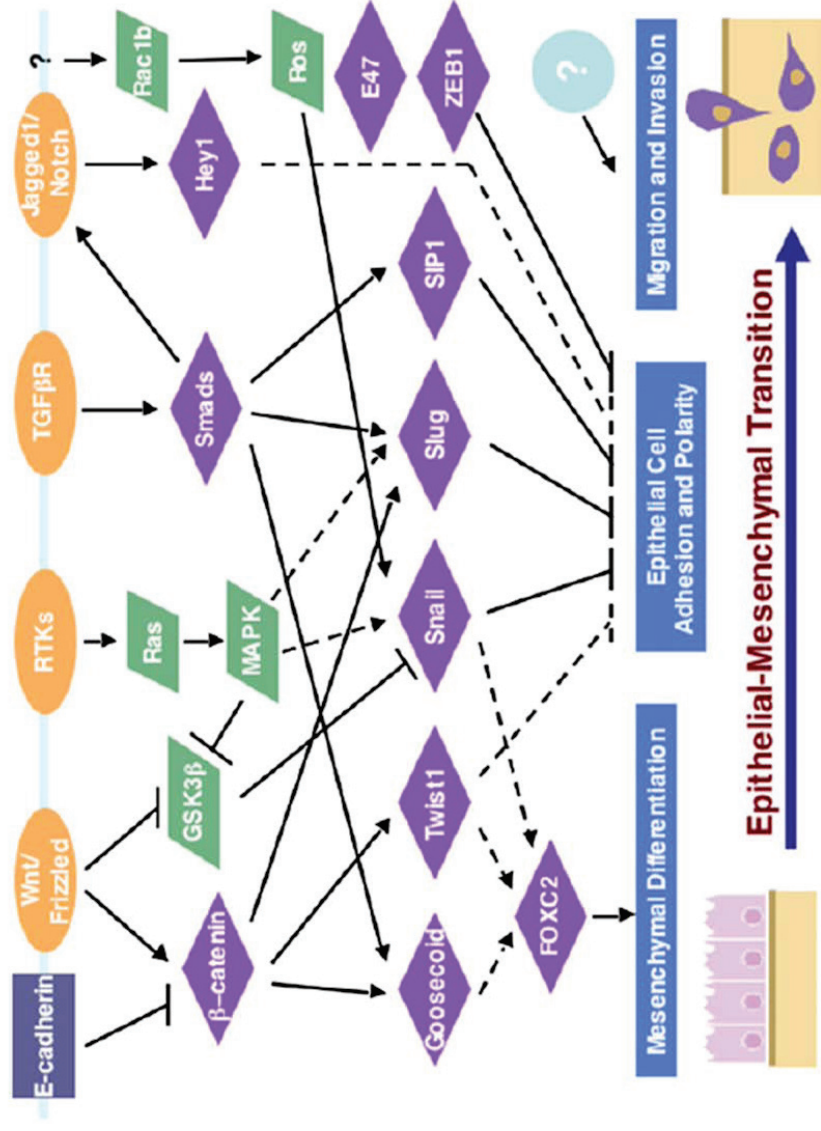




**Figure 12. : Représentation schématique des types de jonctions entre cellules épithéliales.**

Les complexes d'adhésion entre les cellules épithéliales sont à la base de l'homéostasie des épithéliums. Parmi ces différents types de jonctions, on compte les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes. La structure de ces jonctions repose sur l'interaction de protéines transmembranaires par le biais de leurs domaines extracellulaires. Par ailleurs, elles sont ancrées au cytosquelette par l'intermédiaire de protéines adaptatrices sous-membranaires.

Figure issue de Thiery J-P. & Sleeman J-P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006.

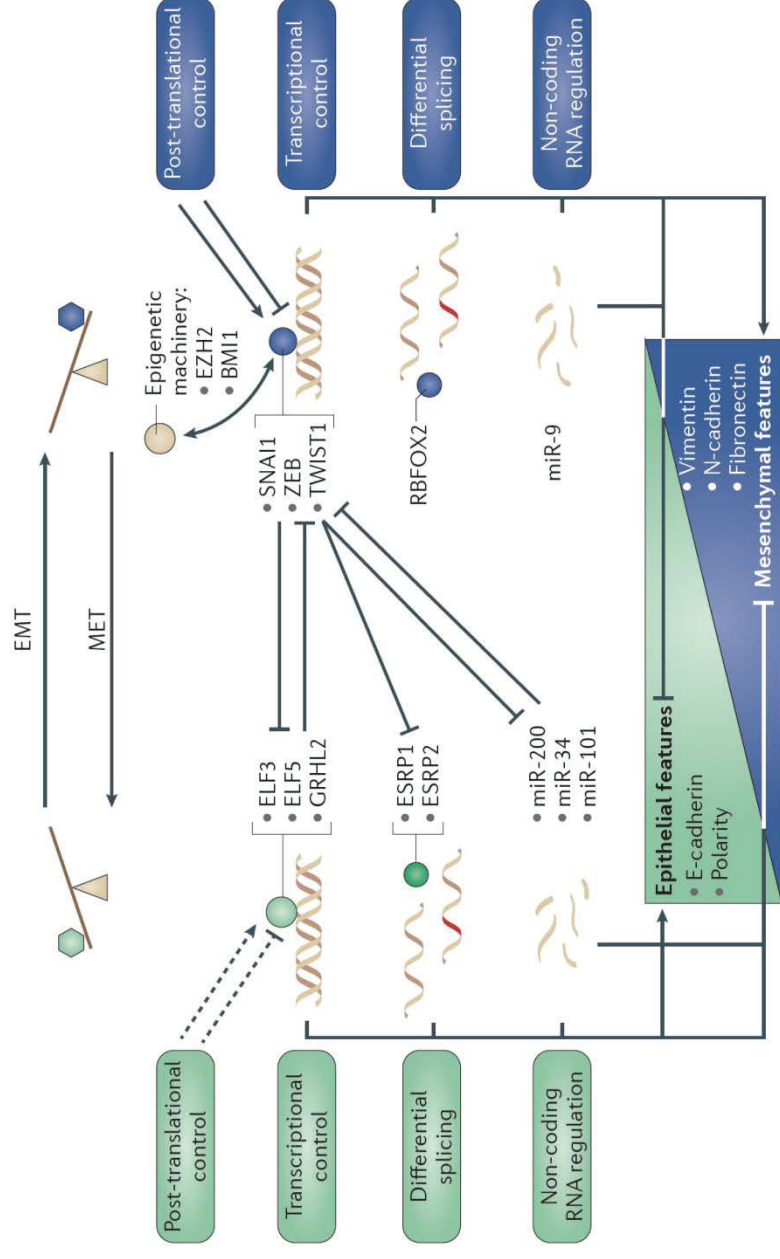


**Figure 13 :** Représentation schématique de l'interconnexion des voies de signalisation régulant le programme d'EMT.

L'ensemble des voies de signalisation régulant l'EMT aboutit *in fine* à l'activation de facteurs de transcription embryonnaires et à la reprogrammation génétique conséquente, nécessaire aux changements phénotypiques et fonctionnels liés à l'EMT.

Figure issue de Yang J. & Weinberg RA., *Dev. Cell* 2008.





**Figure 14: Régulation du programme d'EMT.**

Le programme d'EMT est régulé par un réseau complexe de facteurs de transcription et de mi-RNAs comprenant de nombreuses boucles d'auto-régulations. Cette complexité est accentuée par la présence de niveaux supplémentaires de régulations post-transcriptionnelles (épissages alternatifs spécifiques) et post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitynation...).

Figure issue de De Craene B. & Berx G., *Nat. Rev. Cancer* 2013.

contribuent également aux différences de susceptibilité des cellules à s'engager dans une EMT. Cette complexité suggère que toutes les cellules mésenchymateuses résultantes d'une EMT puissent être fonctionnellement distinctes, conférant ainsi aux cellules des niveaux de plasticité différents. De plus, les voies oncosuppressives régulées par les protéines RB et p53 influent également sur l'EMT, établissant de fait des liens entre l'état de prolifération des cellules, potentiellement les mécanismes de sauvegarde cellulaires et l'EMT (Jiang et al., 2010, 2011).

Les familles ZEB, SNAIL et TWIST représentent les trois familles de FTE impliqués dans la régulation de l'EMT. Dans ce mémoire de thèse, nous nous focaliserons en particulier sur les membres de la famille TWIST.

## **II. Les fonctions de l'EMT dans le développement tumoral.**

### **II.1. Rôle de l'EMT dans la dissémination métastatique.**

La grande majorité des tumeurs malignes humaines sont des carcinomes, c'est-à-dire d'origine épithéliale. L'apparition de métastases au cours de la progression de la tumeur est responsable de la plupart des décès liés à la pathologie (Eccles and Welch, 2007). La progression métastatique est un processus complexe, en plusieurs étapes, qui implique une invasion des tissus environnants, suivie par une diffusion des cellules malignes à l'aide des flux circulatoires (sanguins, lymphatiques) de l'organisme, et enfin leur rétablissement dans des sites secondaires distants pouvant éventuellement générer des métastases (Woodhouse et al., 1997).

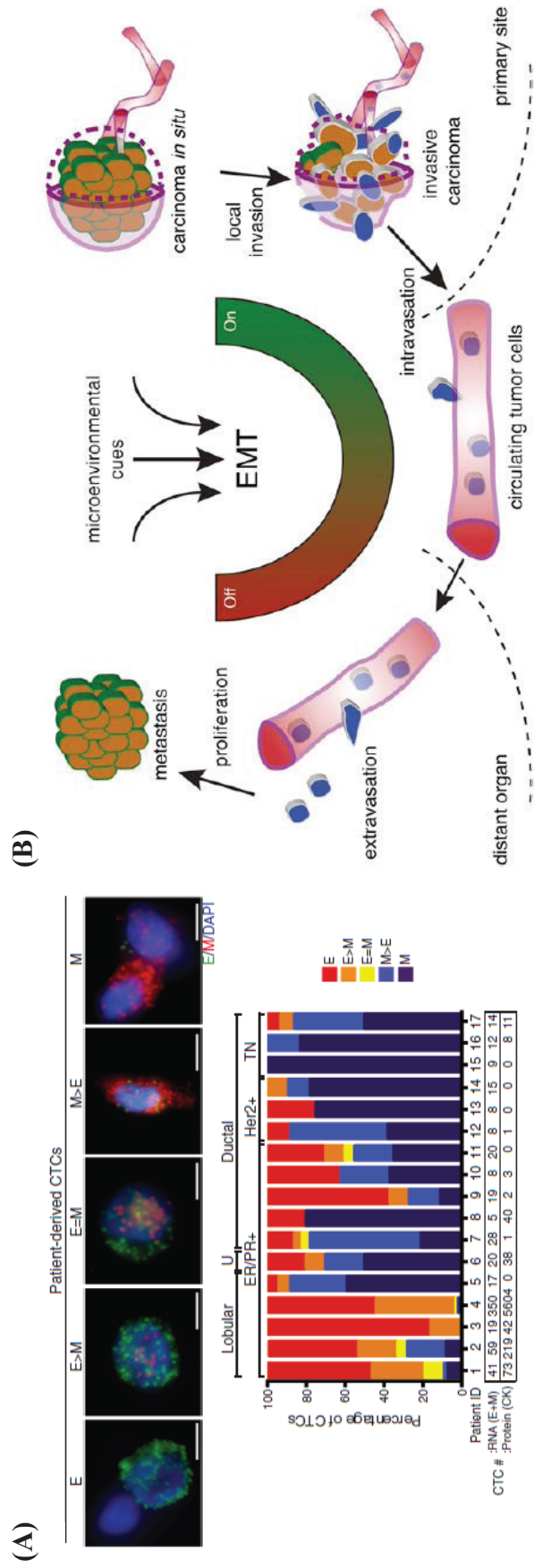
Le modèle linéaire de la progression tumorale suppose que les propriétés nécessaires à la formation de métastases, y compris la dissociation, la migration et la diffusion, soient acquises et fixées par des altérations génétiques à des temps tardifs de la cancérogenèse. Cependant, une observation communément faite par les pathologistes, est que les métastases présentent des structures épithéliales semblables à celle de la tumeur primaire. Ces observations suggèrent qu'une fois le processus métastatique achevé, les cellules tumorales sont capables de retrouver un

phénotype épithélial. Par conséquent, le phénotype dédifférencié arboré par les cellules métastatiques au cours des processus d'invasion et de diffusion, ne peut être fixé de manière irrévocable par des altérations génétiques. De plus, de récents travaux ont démontré la présence de micrométastases détectées alors que la tumeur primaire ne se trouve encore qu'à des phases précoces (Bidard et al., 2008; Pantel and Brakenhoff, 2004), mettant à mal le schéma classique de progression proposé à l'origine par Nowell puis défendu par Vogelstein (Nowell, 1976; Sidransky et al., 1992; Vogelstein et al., 1985).

Cette plasticité cellulaire observée au niveau des cellules métastatiques, ainsi que les propriétés d'invasion et de migration ne sont pas sans rappeler certaines caractéristiques de l'EMT. De ce fait, une des hypothèses avancées a été de dire que les cellules épithéliales de la tumeur primaire subissaient une EMT afin de se dédifférencier en vue d'accomplir les différentes étapes (invasion, diffusion,...) nécessaires au processus métastatique. Cette hypothèse suppose également que, sur les sites éloignés, les métastases puissent réacquérir un phénotype épithélial par le phénomène inverse de MET, pour former des tumeurs secondaires (processus semblable à celui observé au cours du développement de l'épithélium rénal) (Davies, 1996). Une des premières observations étayant cette hypothèse a été faite dans le carcinome du côlon. Brabletz et collaborateurs démontrèrent la présence de cellules ayant subi une EMT au niveau des fronts invasifs. En effet, l'accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine observée uniquement au niveau des fronts invasifs de la tumeur, coïncide avec une perte d'expression ou tout du moins une relocalisation cytoplasmique de la E-cadhérine, caractéristique d'une EMT. A l'inverse, le centre de la tumeur primaire ainsi que les métastases présentent une localisation membranaire voir cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine ainsi qu'une expression membranaire de la E-cadhérine, attestant du phénotype épithélial des cellules (Brabletz et al., 2001). Même si plusieurs équipes se sont étonnées de cette corrélation entre présence de E-cadhérine et métastases, du fait de la perte de son expression au niveau des fronts invasifs puis sa réexpression au niveau des foyers secondaires, le papier de Brabletz est un des premiers à clairement faire le lien entre l'EMT et l'initiation de la cascade métastatique (Heimann et al., 2000; Kaihara et al., 2003; Katagiri et al., 1995; Oka et al., 1993; Yoshida et al., 2001). Par la suite, de nombreux travaux ont mis en évidence une réactivation aberrante de ce programme embryonnaire dans un grand nombre de tumeurs (Onder et al., 2008; Thiery, 2002; Yang and Weinberg, 2008).

En dépit des observations rapportées précédemment, la participation *in vivo* de l'EMT dans le processus d'invasion et de métastases a longtemps été remise en question (Tarin et al., 2005). Il existe, en effet, deux raisons majeures à cela. La première repose sur le fait que les pathologistes n'observent pas, au sein des tumeurs épithéliales, la présence de cellules en EMT. La deuxième est due à la nature épithéliale des métastases issues de carcinomes. Malgré ces difficultés d'identification, différents travaux ont apporté des arguments forts, soutenant le rôle de ce processus au cours de la progression tumorale. L'équipe de Brabletz a pu démontrer la présence de marqueurs de cellules dédifférenciées et des caractéristiques de cellules ayant subi une EMT sur les fronts invasifs d'échantillons humains de cancers colorectaux (Spaderna et al., 2006). Ces résultats furent confirmés dans plusieurs modèles tumoraux par divers travaux (Ao et al., 2006; Karnoub et al., 2007; Rees et al., 2006). Enfin, la démonstration formelle de l'existence du processus d'EMT *in vivo* fut apportée par Trimboli et collaborateurs, grâce au développement d'un modèle de souris transgénique. Ils générèrent un modèle exprimant, spécifiquement au niveau des cellules épithéliales mammaires, l'oncogène *c-MYC* ainsi que le rapporteur LacZ (WAP-*cMyc* ; ROSA-LSL-*LacZ* ; WAP-*Cre*). Grâce à ces souris, ils observèrent la présence de cellules mammaires mésenchymateuses LacZ<sup>+</sup>, démontrant ainsi la véracité du processus d'EMT *in vivo* (Trimboli et al., 2008). Nous savons aujourd'hui que les étapes de la dissémination métastatique impliquant l'EMT sont multiples et concernent l'invasion des tissus adjacents, l'intravasation, la survie dans les flux et l'extravasation (Thiery et al., 2009). Seule l'étape de colonisation semble davantage requérir le retour à un phénotype épithélial (Figure 15) (Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012).

Au-delà du rôle communément accepté de l'EMT dans la dissémination métastatique, de nombreuses données semblent indiquer que ce processus de transdifférenciation constituerait un mécanisme d'adaptation permettant aux cellules d'échapper à divers stress, l'associant ainsi aux problèmes de récidence (Peinado et al., 2007). Des travaux récents menés au laboratoire démontrent par ailleurs, que l'échappement à la senescence induit par la protéine TWIST1 *in vitro*, s'accompagnait de l'induction d'une EMT partielle, favorisant la transformation de cellules épithéliales humaines en réponse à une simple activation oncogénique, suggérant que dans certaines conditions (environnement permissif), les deux mécanismes puissent être concomitants (Ansieau et al., 2008; Morel et al., 2012). L'induction aberrante de l'EMT pourrait donc faciliter l'initiation tumorale mais également conduire au développement de tumeurs agressives et



**Figure 15:** *La colonisation métastatique requiert un retour vers un statut épithélial (MET).*

(A) Le panel montre le degré d'engagement des cellules tumorales circulantes issues de patients atteints de tumeurs mammaires dans le programme d'EMT. Plutôt qu'un équilibre entre deux états phénotypiques, l'EMT apparaît comme un ensemble d'états cellulaires distincts, reflète de multiples niveaux de reprogrammation et de l'importante plasticité allouée aux cellules. Cette plasticité permet aux cellules de s'adapter aux métastases issues de carcinomes étant des carcinomes, un retour vers un statut épithélial (MET) précède la colonisation du site secondaire. Si l'idée d'une succession d'EMT et de MET est communément acceptée en embryologie, il semble qu'il en est de même au cours du processus métastatique.

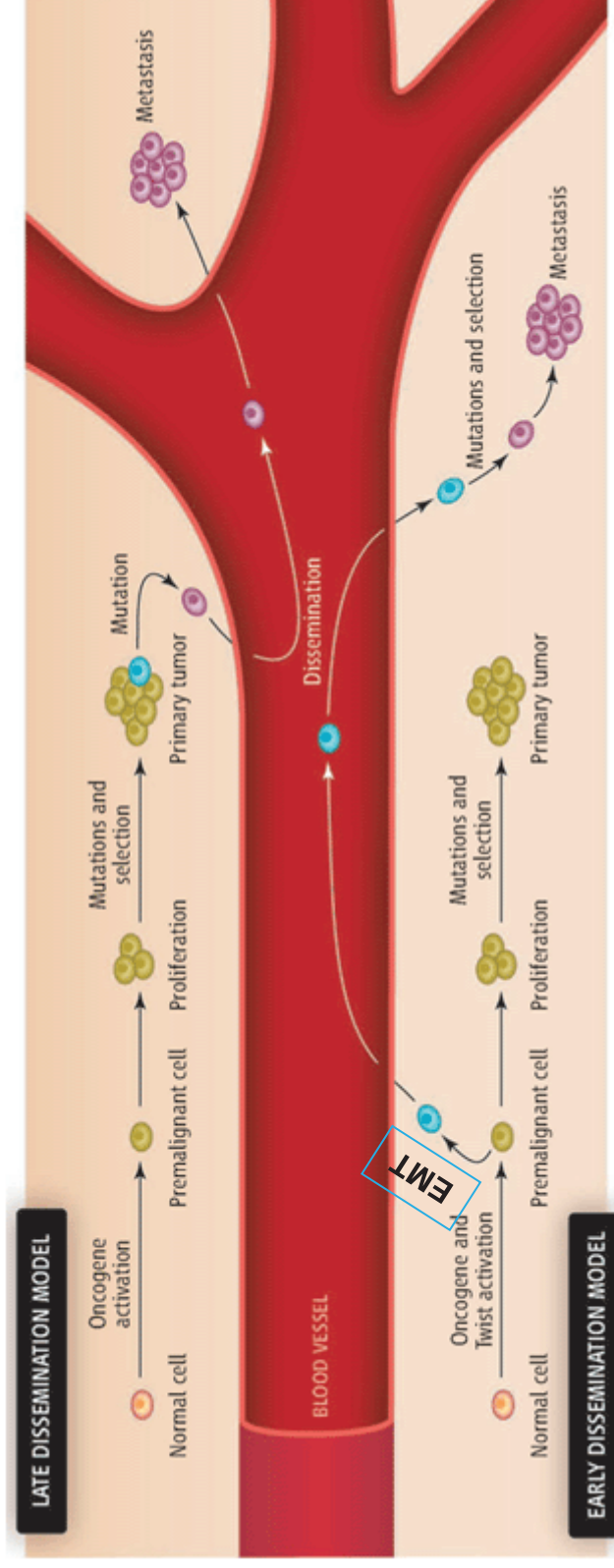
Figures issues de Yu M. et al., *Science* 2013 et Tsai JH. et al., *Cancer Cell* 2012

d'emblée métastatiques. Cette hypothèse est confortée par la caractérisation, dans la moelle osseuse de patients atteints de cancer du sein, de cellules épithéliales mammaires présentant très peu d'altérations génétiques, suggérant ainsi une dissémination précoce de ces cellules, avant même ou de manière concomitante à la mise en place d'un phénotype mammaire malin. D'élégantes expériences menées par l'équipe du Pr. Klein ont démontré que la dissémination métastatique pouvait être initiée dès le stade de l'hyperplasie dans un modèle murin de progression tumorale mammaire (Figure 16) (Hüsemann et al., 2008).

## **II.2. Mécanisme d'activation de l'EMT.**

Absent des tissus adultes différenciés, certains FTE sont réactivés lors de conditions pathologiques telles que la fibrose ou la tumorigenèse. La comparaison des mécanismes de régulation de l'EMT physiologique (au stade embryonnaire) ou au niveau pathologique montre que l'activation aberrante de ce processus est davantage le résultat de la dérégulation des voies de signalisation que l'émergence de voies nouvellement induites (Figure 17). Outre les voies et signaux décrits précédemment, la réactivation des gènes embryonnaires peut être le résultat de diverses conditions de stress. Ainsi, au cours de la progression tumorale, la compression mécanique, résultant de la prolifération anarchique des cellules, induirait, entre autre, l'expression du gène *TWIST1* par le biais de la voie WNT, d'une manière similaire à celle observée au cours de la formation du mésoderme lors de la gastrulation (Butcher et al., 2009; Desprat et al., 2008; Farge, 2003; Whitehead et al., 2008). De même que, l'hypoxie présente au cœur de la tumeur primaire, notamment du fait de l'hyper-prolifération cellulaire ainsi que du déficit d'angiogenèse, induit l'expression des gènes *TWIST1* et *SNAIL* via l'activation d'un facteur de transcription sensible à la pression en oxygène, HIF-1 (Cannito et al., 2008; Gort et al., 2008; Imai et al., 2003; Yang et al., 2008). L'EMT s'avère également être un point de convergence important entre l'inflammation et la progression tumorale (López-Novoa and Nieto, 2009). En effet, certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , permettent le recrutement de cellules immunitaires au niveau de l'interface tumeur-stroma. Ces cellules, ainsi que les fibroblastes activés jouxtant la tumeur, vont par la suite sécréter, en parallèle du TNF- $\alpha$ , d'autres facteurs tels que le TGF- $\beta$  pour finalement générer un environnement permissif à l'EMT.

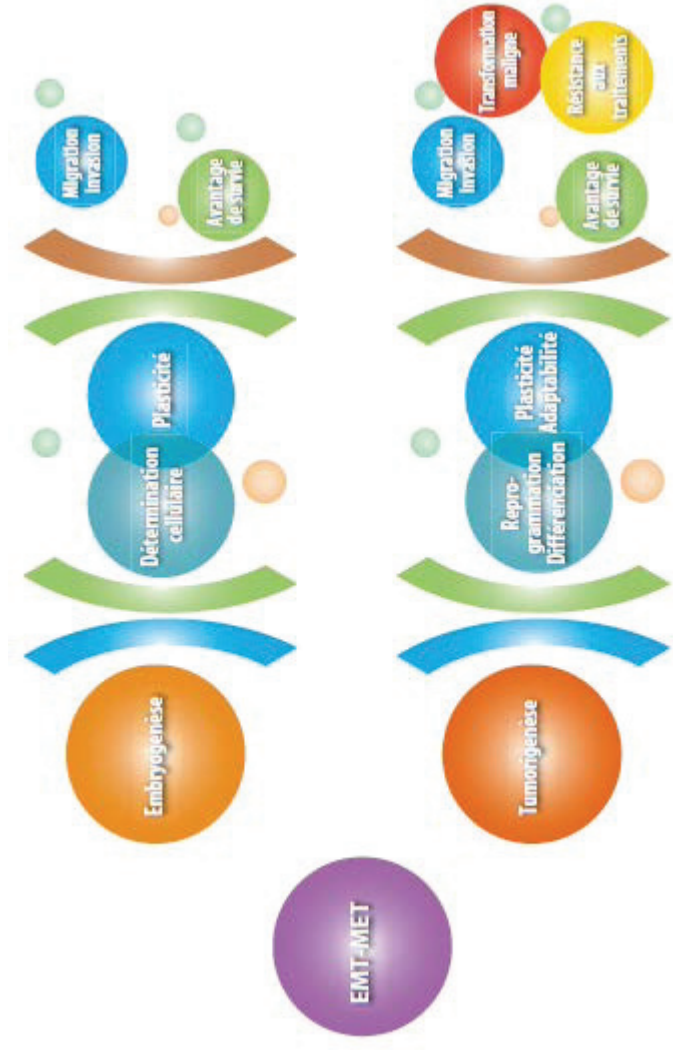




**Figure 16 : Le concept de dissémination métastatique précoce.**

La vision classique de la progression tumorale est que la dissémination métastatique des cellules cancéreuses constitue un évènement tardif reposant sur l'acquisition d'un nombre important d'altérations. Cette hypothèse implique que la tumeur primaire et les métastases associées soient très similaires d'un point de vue génétique. Les travaux, développés principalement par l'équipe du Dr C. Klein suggèrent que, dans un certain nombre de cas (cancers du sein et de l'oesophage), la dissémination métastatique puisse être initiée de manière antérieure à la formation de la tumeur primaire, à partir des lésions pré-néoplasiques. Ces cellules évolueraient indépendamment de la tumeur primaire et donneraient, le cas échéant, naissance à des métastases génétiquement distinctes d'une éventuelle tumeur primaire.

Figure adaptée de Klein C., *Science* 2008.



**Figure 17:** Mise en parallèle des propriétés associées à l'EMT au cours de l'embryogenèse et de la tumorigenèse.

Figure issue de Ansieau S. et Jacquaroud L., *Thérapie Ciblée des cancers* 2013.



Les travaux d'Erez et collaborateurs notamment, ont mis en évidence le rôle de la protéine NF- $\kappa$ B dans les effets pro-tumoraux de l'inflammation (Erez et al., 2010). Le facteur NF- $\kappa$ B se révèle être un puissant activateur transcriptionnel des gènes *SNAIL*, *TWIST1* et *ZEB1* (Chua et al., 2007; Li et al., 2012a; Zhang et al., 2011). Par ailleurs, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B permet la stabilisation de la protéine SNAIL1 dans diverses lignées tumorales (sein, colon, prostate) afin de favoriser l'initiation de la cascade métastatique (Wu et al., 2009).

Au-delà des conditions de stress, la réactivation de ces gènes embryonnaires peut être le résultat d'activations oncogéniques. Dans le cadre du neuroblastome, le gène *TWIST1* est une cible transcriptionnelle du facteur N-MYC (Selmi et al., 2014; Valsesia-Wittmann et al., 2004). Récemment, le laboratoire a mis en évidence que l'activation de la voie NRAS/BRAF conduit à un remaniement profond de l'expression des facteurs de transcription embryonnaires dans les mélanocytes (inhibition de l'expression des gènes *ZEB2* et *SNAIL2* et induction des gènes *TWIST1* et *ZEB1*), favorisant de fait la dédifférenciation des cellules, leur transformation maligne et leur dissémination (Caramel et al., 2013).

L'interconnexion des FTE ne permet pas seulement la redondance de l'induction d'une EMT mais possède un rôle fonctionnel à part entière comme l'ont montré les travaux de D. Tran et collaborateurs (Tran et al., 2011). En effet, ils démontrent l'existence d'une coopération temporelle et spatiale des FTE SNAIL1 et TWIST1 dans un modèle de cancer du sein. Dans cette étude, les chercheurs ont utilisé une approche se détachant des analyses généralement basées sur la surexpression des FTE, la réponse à un signal environnemental étant par définition transitoire ou du moins modulable. En utilisant une approche couplant de l'ARN interférence ainsi que des cycles de traitements des cellules au TGF- $\beta$ , permettant de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques, les chercheurs ont montré, que ce soit dans des lignées épithéliales transformées ou non, que seule la protéine SNAIL1 est requise pour l'initiation de l'EMT, alors que la protéine TWIST1 est nécessaire au maintien à long terme du phénotype mésenchymateux. En réponse à un traitement transitoire au TGF- $\beta$ , on observe une expression temporaire de la protéine SNAIL1, au bord invasif de la tumeur primaire, qui conduit à l'induction de l'EMT tout en réprimant directement l'expression de la protéine TWIST1. Par la suite, l'expression de la protéine SNAIL1 diminue, atténuant son effet répresseur sur la protéine TWIST1 qui permet le maintien du phénotype d'EMT au cours des étapes ultérieures de la dissémination métastatique et de la

dormance des micrométastases associées. Par ailleurs, cette coopération est retrouvée dans des études chez les patients, où le ratio TWIST1 : SNAIL1 corrèle avec la présence de micrométastases dans la moelle osseuse et se révèle être un marqueur prédictif puissant de la résistance aux traitements et le développement de métastases, le tout conduisant à une faible survie (Tran et al., 2011).

La complexité des réseaux et la modulation fines des voies de signalisation qui la régulent, permettent aux cellules de s'engager à différents niveaux (partielle ou totale) dans l'EMT. Si l'EMT totale est associée à la dissémination de cellules isolées, l'EMT partielle et le maintien d'une certaine cohésion intercellulaire en résultant est associée à la dissémination collective (Friedl and Gilmour, 2009). A ce titre, les travaux de Shamir et collaborateurs confirment l'importance de l'EMT partielle dans la dissémination métastatique. En effet, les résultats du laboratoire démontrent que le maintien de l'E-cadhérine est nécessaire lors de la migration individuelle des cellules exprimant la protéine TWIST1. Ces cellules expriment donc plusieurs marqueurs mésenchymateux tout en conservant un phénotype épithélial (Shamir et al., 2014). L'inhibition, dans ce même modèle, de l'expression de la E-Cadhérine conduit à la formation de structures membranaires type invadopodes. Indépendamment, les travaux de Eckert et collaborateurs ont montré que la protéine TWIST1 est nécessaire et suffisante à la formation d'invadopodes en conduisant à l'augmentation de l'expression de la kinase SRC en réponse à une augmentation du facteur PDGFR $\alpha$ . Cette caractéristique semble propre au facteur TWIST1 étant donné que l'inhibition de son expression dans des cellules exprimant de manière ectopique la protéine SNAIL1 conduit à l'absence de formation de ces structures d'invasion. De plus, la présence d'invadopodes dans les cellules exprimant le facteur SNAIL1 est due à l'activation de l'expression transcriptionnelle de *TWIST1* par SNAIL1 (Eckert et al., 2011).

### **II.3. EMT et dédifférenciation**

Si l'on part du principe qu'une unique cellule en EMT soit capable de former une tumeur hétérogène, implicitement cela veut dire que cette cellule doit être dotée du potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation, des propriétés attribuées aux cellules souches. Cette hypothèse soulève la possibilité que le processus d'EMT, en plus de permettre la dissémination cellulaires, s'accompagne de la ré-acquisition de certaines propriétés de cellules souches (Brabletz et al., 2005). A cet égard, le processus métastatique est, au moins superficiellement, similaire à des processus qui se produisent au cours de la réparation et régénération tissulaire. Lors de ces phénomènes physiologiques, des cellules souches adultes sortent de tissus « réservoirs », tels que la moelle osseuse, entrent et survivent dans la circulation sanguine puis atteignent les sites affectés, prolifèrent et se différencient afin de participer à la reconstruction tissulaire (Kondo et al., 2003). De plus, des expériences de reconstitution de glandes mammaires avec ces cellules souches conduit à la formation d'arbres ductaux exprimant de la vimentine, posant ainsi la question d'une éventuelle nature mésenchymateuse de ces cellules souches (Guo et al., 2012). Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent l'existence d'un possible lien entre les cellules souches et cellules mésenchymateuses issues de l'EMT.

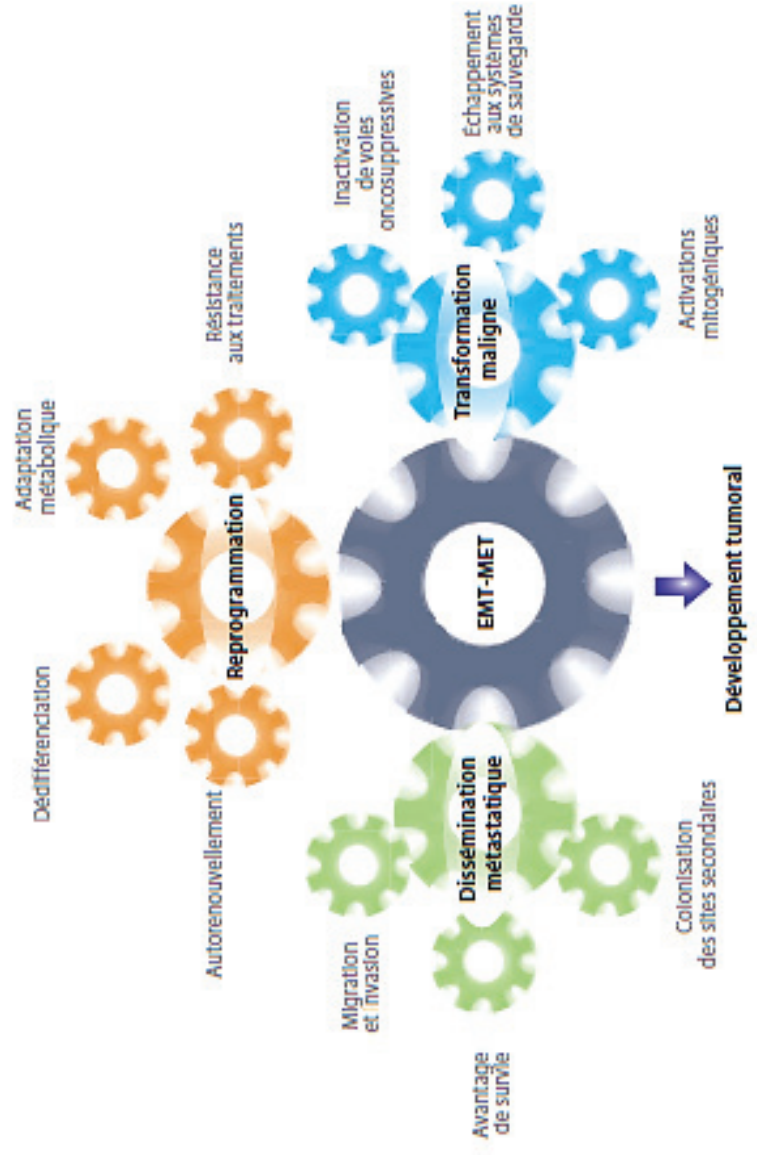
Mani et collaborateurs ainsi que le laboratoire ont depuis montré de manière indépendante que l'engagement dans le processus d'EMT au cours de la transformation de cellules épithéliales mammaires conduit à la formation de cellules souches cancéreuses. Ces cellules présentent un profil antigénique  $CD44^{+} / CD24^{-/faible}$ , profil qui à l'origine était attribué aux cellules souches cancéreuses mammaires (Al-Hajj et al., 2003). De plus, ces cellules sont capables de former des mammosphères (dans des conditions de culture non-adhérentes) et présentent un pouvoir tumorigène chez la souris *nude* (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Parallèlement à cela, il a été montré que les cellules  $CD44^{+} / CD24^{-/faible}$ , issues de tissus mammaires sains ou de carcinomes mammaires, expriment des marqueurs mésenchymateux ainsi que des inducteurs d'EMT tels que les protéines TWIST (Mani et al., 2008). Ces mêmes inducteurs d'EMT sont retrouvés exprimés dans des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle épinière. Après leur mise en culture, les cellules perdent peu à peu l'expression de ces protéines, probablement dû à leur différenciation. Or, l'expression ectopique des deux inducteurs d'EMT

dans ces cellules conduit à un maintien d'un état dédifférencié (Isenmann et al., 2009). En outre, d'autres travaux ont élégamment montré que la protéine TWIST1 est capable d'induire l'expression la protéine BMI-1, acteur important du caractère souches des cellules. Les protéines TWIST1 et BMI-1 coopèrent également afin de réprimer l'expression de la E-cadhérine (Martin and Cano, 2010; Yang et al., 2010). D'autres études associent EMT et propriétés de cellules souches. Ainsi, le facteur de transcription embryonnaire ZEB1, régule négativement un pool de miRNA inhibant les gènes de stemness *SOX2* et *KLF4* et n'est exprimé que dans des zones dédifférenciées de cancers pancréatiques et de colons (Wellner et al., 2009).

Prises dans leur ensemble, ces observations suggèrent que les cellules à l'origine de la tumeur peuvent provenir de la transformation maligne de cellules souches saines, mais aussi de la dédifférenciation de cellules épithéliales par le processus d'EMT.

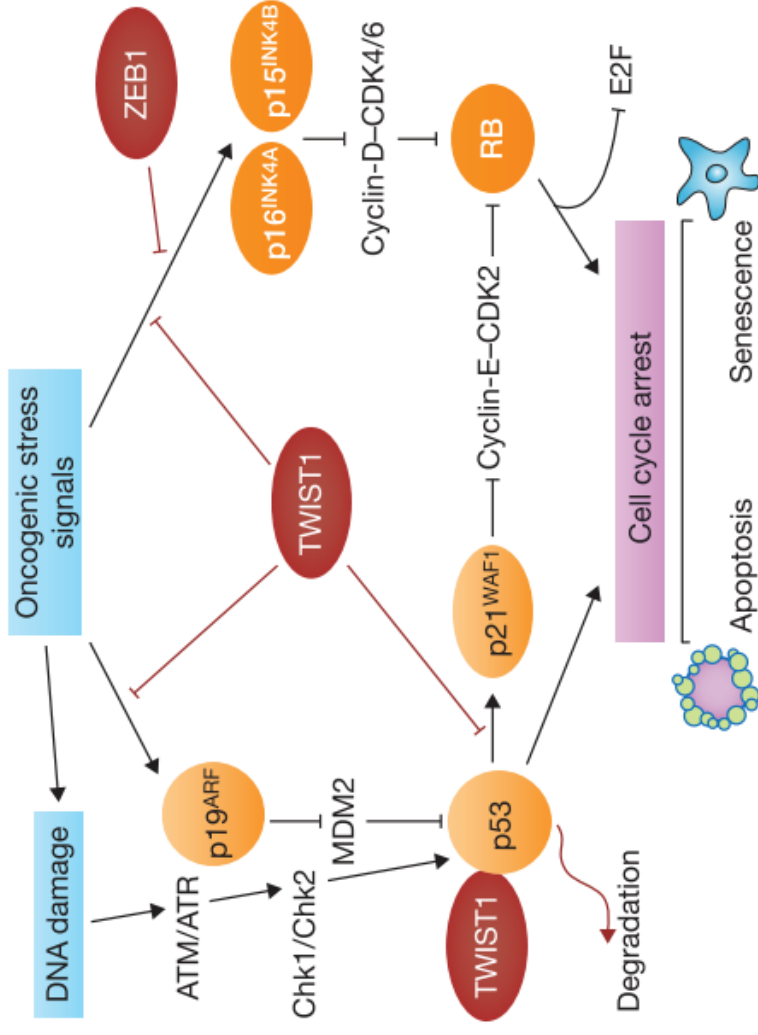
#### **II.4. Les propriétés oncogéniques de l'EMT**

En marge de son rôle dans la dissémination métastatique, bon nombre d'études récentes démontrent que l'EMT est impliquée dans d'autres étapes de la progression tumorale (Figure 18). La protéine ZEB1 a notamment clairement été identifiée comme étant nécessaire à la transformation par l'oncogène RAS dans un modèle de carcinomagenèse pulmonaire (Liu et al., 2014). Par ailleurs, les travaux réalisés au laboratoire ont permis de démontrer que la réactivation du gène *TWIST1* permet, non seulement, d'abolir les systèmes de sauvegarde cellulaires induits en réponse à une activation oncogénique de type RAS ou N-MYC mais également de coopérer avec ces oncoprotéines dans la transformation de cellules *in vitro* et *in vivo* (Ansieau et al., 2008; Morel et al., 2012; Valsesia-Wittmann et al., 2004). La capacité de la protéine TWIST1 à induire et à maintenir l'inhibition de la sénescence prématurée a depuis été confirmée dans des modèles transgéniques d'adénocarcinomes pulmonaires et prostatiques (détaillé dans la partie Twist) (Morel et al., 2012; Tran et al., 2012). Par ailleurs, l'inhibition des systèmes de sauvegarde cellulaires semble être une propriété partagée par les différents inducteurs d'EMT (Figure 19). En effet, la protéine ZEB1 maintient la prolifération des fibroblastes en réprimant directement la transcription des gènes *CIP1*, *INK4B*, *INK4A* et *ARF* (Browne et al., 2010; Liu et al., 2008). Pour



**Figure 18:** Conséquences liées à l'induction des programmes d'EMT et de MET au cours de la progression tumorale.

Figure issue de Ansieau S. et Jacqueroud L., *Thérapie Ciblée des cancers* 2013.



**Figure 19 :** *Inhibition des systèmes de sauvegarde cellulaires par les facteurs de transcription embryonnaires.*

Les processus d'apoptose et de sénescence induits en réponse à une activation oncogénique constituent des barrières physiologiques érigées dans les lésions pré-néoplasiques pour permettre l'élimination des cellules à risque. Les facteurs de transcription embryonnaires permettent de neutraliser ces systèmes de sauvegarde en altérant l'expression des régulateurs clef des voies dépendantes des protéines p53 et RB.

Les facteurs de transcription embryonnaires sont représentés en rouge, les composants de la voie dépendante de p53 en orange clair et ceux de la voie RB en orange foncé.

Figure issue de Puisieux A. et al., *Nat. Cell Biol.* 2014.

sa part, la protéine ZEB2 a été démontrée comme étant capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 au travers d'une répression directe de la transcription du gène CCND1 (cycline D1) (Browne et al., 2010; Mejlvang et al., 2007). De plus, elle semble protéger les cellules de l'apoptose en inhibant, en réponse à un stress génotoxique, le clivage des protéines PARP et caspase-3 (Sayan et al., 2009). Par ailleurs, la protéine SNAIL2 inhibe la voie mitochondriale de l'apoptose en abolissant l'activation du gène *PUMA* (inhibiteur du facteur anti-apoptotique BCL-2), qui est un médiateur phare de l'apoptose dépendante de p53 (Wu et al., 2005).

Bien que les propriétés intrinsèques des différents inducteurs d'EMT contribuent indiscutablement à la transformation néoplasique, l'EMT s'accompagne d'une profonde restructuration de la chromatine par le biais de mécanismes épigénétiques (Dumont et al., 2008; McDonald et al., 2011). D'autres études ont également constaté des modulations d'épissage dans les cellules engagées dans un programme d'EMT (Shapiro et al., 2011; Warzecha and Carstens, 2012). Les cellules en EMT subissent donc une reprogrammation génique profonde (Taube et al., 2010). Récemment, le laboratoire a démontré qu'en réponse à l'activation de la voie NRAS/BRAF, on observe une profonde réorganisation de l'expression des FTE, conduisant à une perte d'expression des protéines ZEB2 et SNAIL2 exprimés dans les mélanocytes sains, au profit de l'expression des protéines ZEB1 et TWIST1. Cette modulation d'expression de ces facteurs de transcription embryonnaires, coopère avec BRAF dans la dédifférenciation et la transformation néoplasique des mélanocytes (Caramel et al., 2013). Rappelons que cette dédifférenciation est connu pour être favorisée par l'expression des FTE et de l'EMT associée (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). De récents travaux renforcent cette hypothèse en montrant que l'expression de SNAIL1 est nécessaire au maintien du statut de dédifférenciation des cellules souches mésenchymateuses (Batlle et al., 2013).

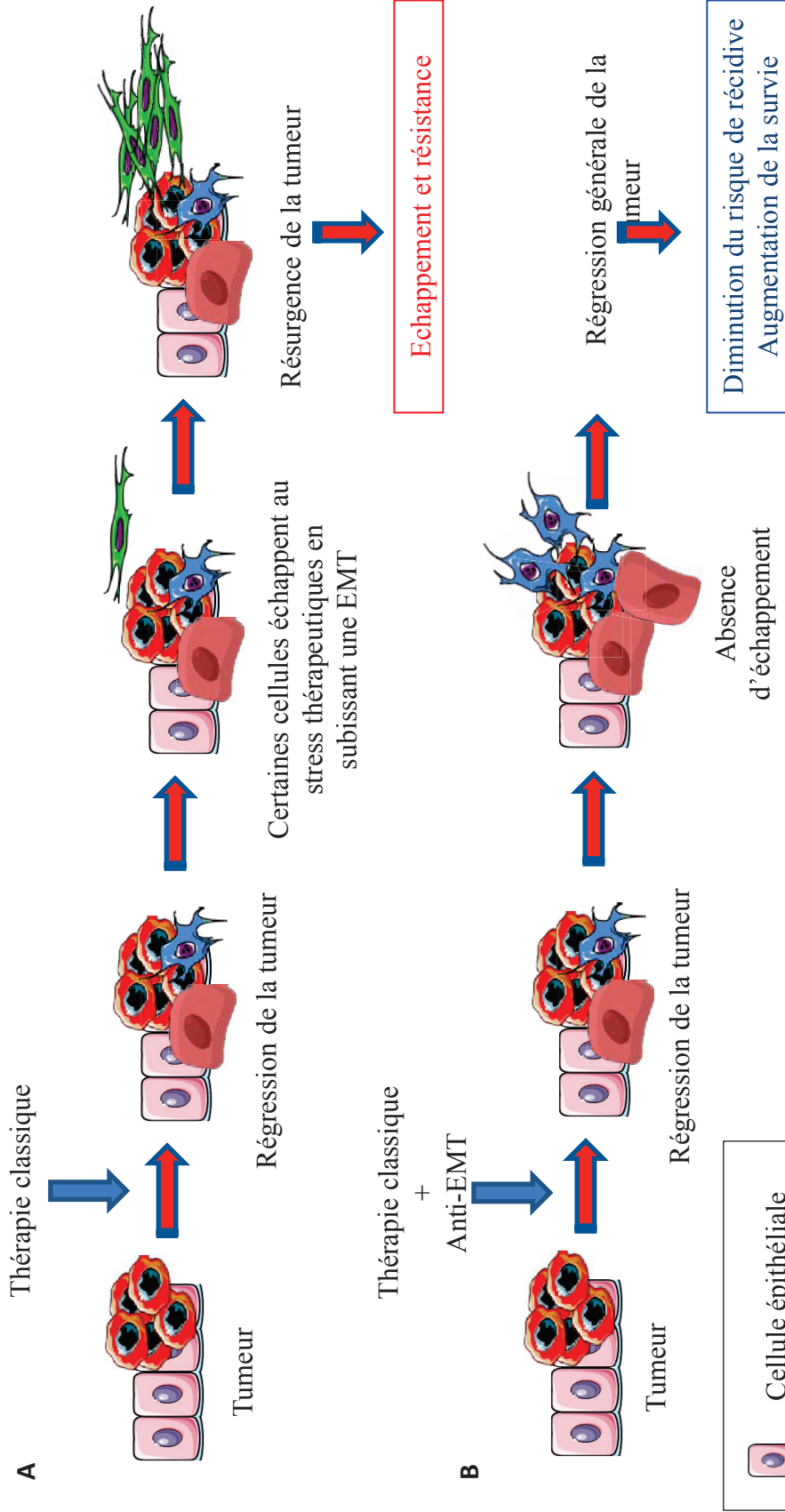


## **II.5. EMT et chimiorésistance**

À la suite d'un diagnostic de cancer, la prise en charge chimiothérapeutique constitue, aux côtés de la chirurgie, une étape déterminante dans la survie des patients atteints. Malgré une réponse initiale majoritairement adéquate, un nombre important de cancers récidiveront peu de temps après la fin de leur(s) traitement(s) (Figure 20). De manière intéressante, dans ces cas de récurrence, la plupart des patients développent une résistance à la chimiothérapie d'origine. La résistance d'un cancer aux médicaments anticancéreux (chimiorésistance) constitue donc un problème majeur en termes de prise en charge par les oncologues. Cette notion de chimiorésistance n'est pas nouvelle et fût déjà abordée en 1970 dans un article publié dans *Cancer Research* par Biedler et collaborateurs (Biedler and Riehm, 1970). Une des approches utilisées pour l'étudier a été d'établir des profils d'expression génique à partir de différentes lignées tumorales issues de divers tissus. Ces profils furent corrélés à la sensibilité aux drogues couramment utilisées pour traiter les tumeurs associées à ces lignées. De manière fort intéressante, l'analyse de profils provenant de cancers du sein ou de l'ovaire par exemple, a permis d'établir une corrélation étroite entre la chimiorésistance des tumeurs et une signature génique associée à l'EMT (Haslehurst et al., 2012; Helleman et al., 2010; Işeri et al., 2011; McConkey et al., 2009).

A partir de là, il fût légitime d'envisager l'EMT comme un mécanisme moléculaire et cellulaire favorisant l'acquisition d'un phénotype de résistance. La reprogrammation génique associée a en réalité des conséquences multiples, en termes d'activation de voies de signalisation, de structures du cytosquelette et de métabolisme. Toutes ces modifications contribuent à octroyer aux cellules une résistance accrue aux traitements thérapeutiques, en déjouant l'effet des drogues dirigées contre certaines voies de signalisation, en inhibant l'efficacité d'agents toxiques et en perturbant l'activation de pro-drogues. En favorisant la dédifférenciation des cellules, l'EMT, accroît d'avantage ces phénomènes de résistance mais est également à l'origine de la récurrence de la pathologie. Ces phénomènes sont, en outre, le résultat de l'expression de transporteurs qui favorisent l'efflux des drogues mais également la résultante des propriétés intrinsèques des facteurs de transcriptions embryonnaires, d'autant plus qu'au niveau physiologique et pathologique, comme discuté précédemment, plusieurs de ces facteurs sont également capables



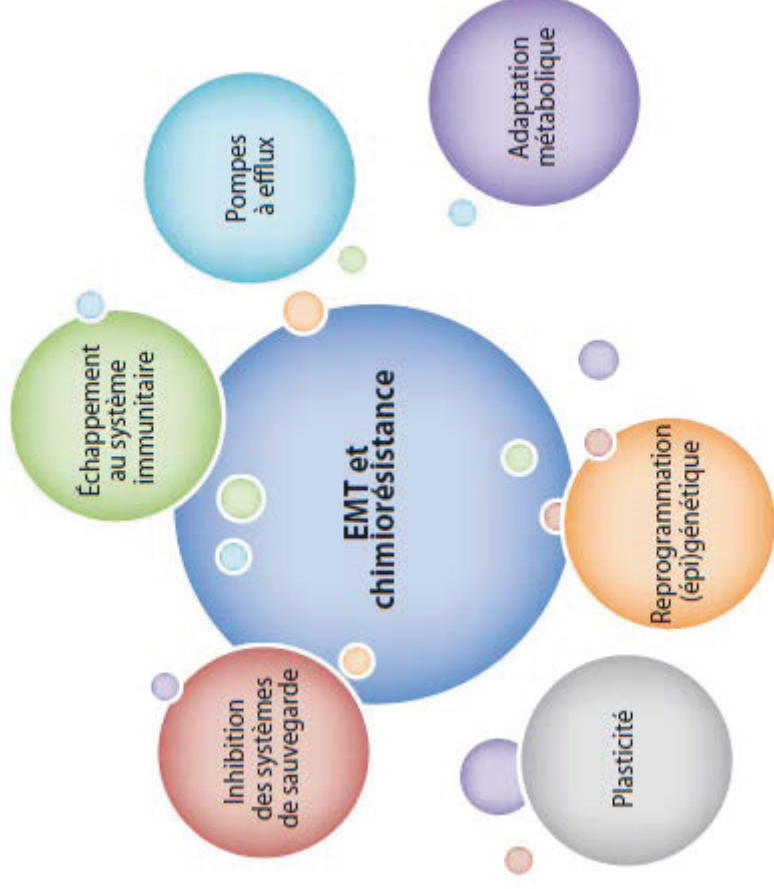


**Figure 20: Comparaison des stratégies thérapeutiques standard et combinée.**

(A) L'administration d'un traitement anticancéreux classique aboutit à la régression tumorale en induisant la mort des cellules par apoptose ou leur entrée en sénescence. La pression de sélection subie par ces cellules peut dans certains cas aboutir à l'induction d'une EMT, permettant aux cellules d'échapper au traitement, engendrant des problèmes de récidence.

(B) Combiner une thérapie classique à une molécule ciblant l'EMT devrait théoriquement permettre d'éviter l'émergence d'une population résistante. Cette stratégie combinée devrait être plus efficace et permettre une régression globale de la tumeur.

d'altérer le bon fonctionnement des mécanismes de sauvegarde cellulaire (Ansieau et al., 2008; LaGamba et al., 2005; Vega et al., 2004). L'expression des certains FTE, et notamment les membres de la famille TWIST, accorde effectivement une résistance aux molécules génotoxiques connues pour induire l'activation des systèmes de sauvegarde. L'inhibition de la voie p53 joue en effet un rôle crucial dans la résistance médiée par la protéine TWIST1 lors de l'exposition à l'adriamycine ou à des rayonnements  $\gamma$  dans divers tissus cancéreux humains (rein, sein, poumon) (Vichalkovski et al., 2010). Dès lors, l'expression des différents facteurs de transcription embryonnaires et la présence d'une EMT furent recherchées dans divers cas de chimiorésistance. Ainsi, loin d'être marginale, l'EMT semble impliquée dans la résistance à un nombre pléthorique de molécules de diverses classes d'action dans une proportion significative de tissus différents aux vues de plusieurs études de corrélation. Les mécanismes impliqués sont nombreux et sont aussi bien imputables à la plasticité et l'adaptabilité accordée par l'EMT qu'aux propriétés intrinsèques des FTE (Figure 21) (pour un recensement plus exhaustif, se référer à « Jacqueroud L. L'EMT : de la plasticité à la chimiorésistance. Thèse d'exercice : Pharmacie : Lyon 1 ; 2013 » et « Jacqueroud L, Ansieau S. La transition épithélio-mésenchymateuse: de la plasticité à la chimiorésistance. Correspondances en Onco-Théranostic 2013 ; 3 : 126-31. »).



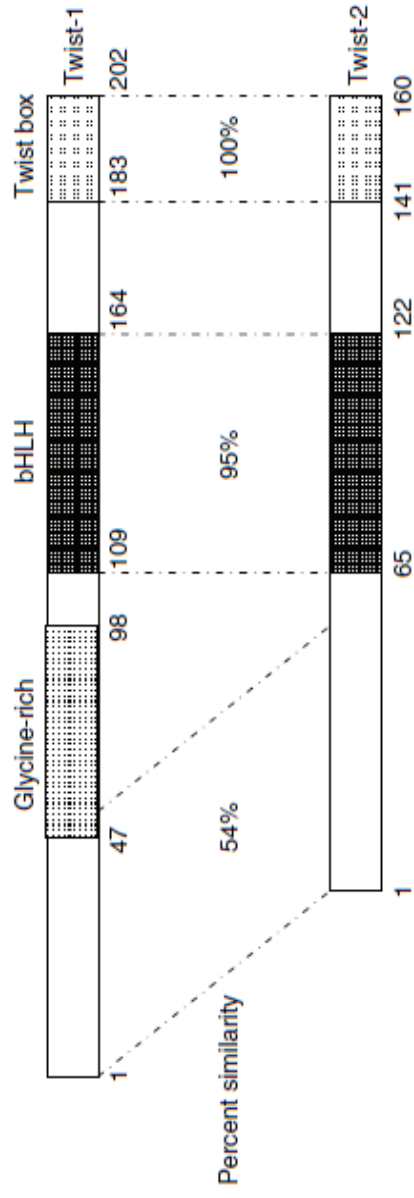
**Figure 21: Mécanismes divers par lesquels l'EMT favorise la résistance aux traitements thérapeutiques.**

Figure issue de Ansieau S. & Jacqueroud L., *Thérapie Ciblée des cancers* 2013.

## **3ème partie : Les protéines TWIST.**

## I. Structure

Structurellement et fonctionnellement conservées au cours de l'évolution (Castanon & Baylies, 2002; Thisse, el Messal, & Perrin-Schmitt, 1987), les protéines TWIST (TWIST1 et TWIST2, anciennement appelé DERMO-1) sont des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'un domaine de fixation à l'ADN de type basique, d'un domaine de dimérisation en hélice-boucle-hélice (protéines b-HLH). Au-delà de ces deux domaines principaux, on peut également noter deux séquences d'adressage nucléaire et la présence d'un domaine d'interaction protéique localisé dans leur extrémité carboxy-terminale et connu sous le nom de domaine WR (ou boîte Twist). En comparaison, les deux protéines divergent davantage dans leur partie amino-terminale avec la présence dans la protéine TWIST1 d'un domaine riche en résidus Glycine, de fonction non définie (Figure 22) (Puisieux et al., 2006). L'importance fonctionnelles des domaines bHLH et du domaine WR ont été démontrés dans le cadre du syndrome de Saethre-Chotzen : un syndrome caractérisé par des anomalies du développement, y compris une crâniosynostose marquée (aspects physiopathologiques développés dans le paragraphe 4.) (Singh and Gramolini, 2009; Su et al., 2011) et lié à une haplo-insuffisance du gène *TWIST1* (el Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997). L'analyse de mutations associées à une perte de fonction de TWIST1 a permis de mettre en évidence l'importance d'un autre motif (S)NSEEE (en particulier la phosphorylation des résidus sérines 18 et 20), mais également celle de séquences situées en amont du domaine WR dans la conformation tridimensionnelle de la protéine ou encore la stabilité de son ARNm (Gripp et al., 2000b; Howard et al., 1997; Qin et al., 2012). En accord avec les effets chez l'humain, le modèle murin « Chaplin » présente une craniosténose ainsi qu'une anomalie des membres postérieurs résultant d'une mutation S192P dans le domaine WR. Au-delà de sa capacité à réguler directement l'expression de gènes en se fixant sur des séquences E-box, la protéine TWIST1, par le biais du domaine WR, interagit directement avec les facteurs de transcription RUNX2 et SOX9, inhibant ainsi leur activité transcriptionnelle nécessaire à la différenciation ostéoblastique et chondrocytique. (Bialek et al., 2004; Gu et al., 2012). Par ce même domaine, la protéine TWIST1 interagit également avec les facteurs de transcription SNAIL1 et SNAIL2 et inhibe ainsi leur capacité à induire la délamination de la crête neurale chez le xénope (Lander et al., 2013). Enfin des mutations au sein de ce domaine conduisent à une perte de l'activité pro-métastatique de TWIST1 dans des lignées de cancer prostatique (Gajula et al.,



**Figure 22: Organisation structurale des protéines *TWIST1* et *TWIST2*.**

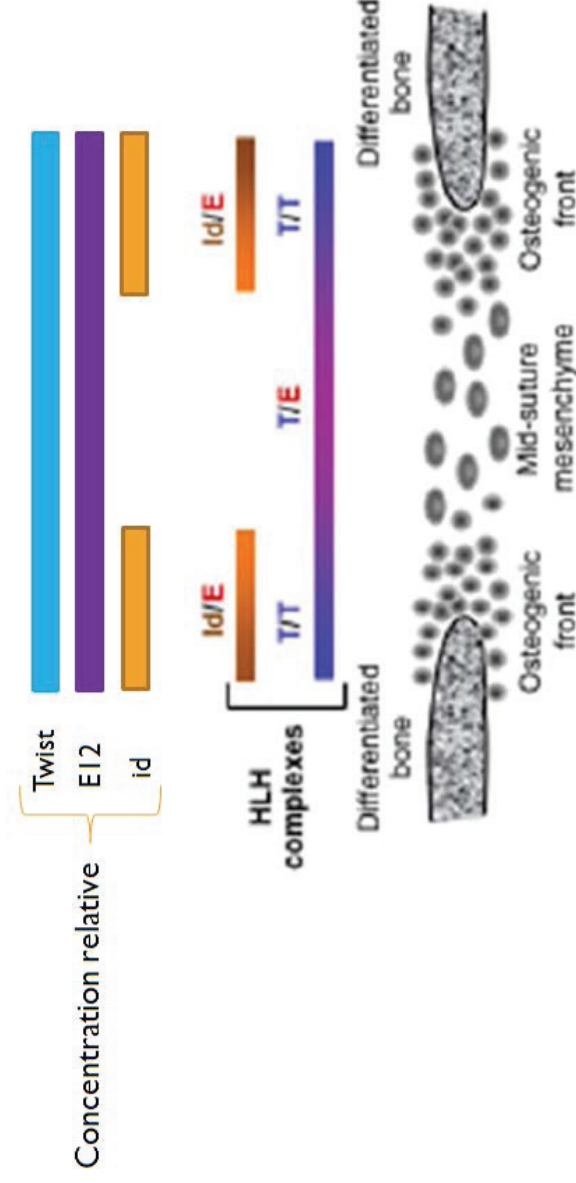
Les deux protéines TWIST présentent entre elles une forte homologie en particulier dans leur domaine de fixation à l'ADN de type basique (b), le domaine de dimérisation en hélice-boucle-hélice (HLH pour helix-loop-helix en anglais) ainsi que le domaine d'interaction protéique C-terminal connu sous le nom de « boîte Twist » ou domaine WR. Le domaine riche en résidus Glycine est spécifique de la protéine TWIST1 et pourrait contribuer à accorder à l'extrémité N-terminale une flexibilité accrue.

Figure issue de Puisieux A. et al., *Br. J. Cancer* 2006.

2013; Li et al., 2012b). Cette perte d'activité pourrait être liée à l'absence d'interaction entre la protéine TWIST1 et le facteur pro-métastatique HOX9 ou la sous-unité RELA du complexe NF- $\kappa$ B. De la même manière, l'interaction entre les protéines p53 et TWIST1 empêche certaines modifications post-traductionnelles clés de p53, dont la phosphorylation du résidu sérine 392, et facilite ainsi l'affinité puis la dégradation de p53 par MDM2 (Piccinin et al., 2012).

Les protéines TWIST sont classées dans le groupe des protéines bHLH dit de classe II, dont l'expression est restreinte à certains types cellulaires, connues pour s'hétéro-dimériser avec les protéines bHLH de classe I, d'expression ubiquitaire, telles les protéines E2A. La protéine TWIST1 présente par ailleurs la particularité de former également des complexes homodimériques fonctionnels (Murre et al., 1989a). Les deux types de complexes TWIST1 possèdent des fonctions distinctes voire antagonistes au cours du développement comme démontré pendant la myogenèse de la Drosophile (Castanon et al., 2001) ou lors du développement des membres et des structures crânio-faciales chez la souris (Connerney et al., 2006, 2008; Spicer et al., 1996). La balance entre homodimères et hétérodimères est gouvernée par un ensemble de facteurs, incluant l'expression relative des partenaires, la modification post-traductionnelle de résidus de la protéine TWIST et la présence de protéines HLH Id (Figure 23) (Connerney et al., 2006, 2008; Firulli et al., 2005). Etant un facteur de transcription, la localisation nucléaire de la protéine est un prérequis à son activité (El Ghouzzi et al., 2000; Schwoebel and Moore, 2000). En cela, il est cohérent que l'altération des séquences d'adressage nucléaire (par exemple, mutation du résidu Lys38) conduit à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de la protéine TWIST1 (Singh and Gramolini, 2009). De manière intéressante, la coexpression de la protéine mutante TWIST1 K38R avec son partenaire E12 génère un dimère correctement localisé dans le noyau.

La protéine TWIST1 fonctionne en tant qu'activateurs ou répresseurs transcriptionnels en recrutant diverses protéines dont les histone acétyl-transférases CBP/p300, des histone désacétylases (HDAC) et le complexe de répression NuRD (Fu et al., 2011; Hamamori et al., 1999). Dernièrement, il a été démontré que l'acétylation de la protéine TWIST1 conduit au recrutement de BRD4, un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille de protéines des BET (bromodomain and extra terminal domain). Les « bromodomains » reconnaissent les résidus lysines acétylés des histones, facilitant ainsi le recrutement de protéines transcriptionnelles au



**Figure 23 :** *Fonctions antagonistes des complexes TWIST1 homodimérique et hétérodimérique au cours de la fusion des os plats du crâne.*

L'expression des protéines TWIST1 (Twist) et E12 est constante tout au long de la suture crânienne. Pour autant, l'expression de la protéine HLH ID1 (id) favorise la formation d'homodimères TWIST1-TWIST1 (T/T) sur les fronts ostéogéniques, l'expression de l'hétérodimère TWIST1-E12 (T/E) étant restreinte au mésenchyme. Complexes T/T et T/E favorisent et inhibent respectivement la différenciation ostéoblastique. Des mutations silencieuses sur un allèle du gène *TWIST1* perturbent cette balance chez des patients atteints du syndrome de Saethre-Chotzen, en faveur du complexe homodimérique T/T conduisant à une fusion prématurée des os.

Figure issue de Connerney J. et al., *Dev. Dyn.* 2006.



niveau de la chromatine. En cela, l'histone H4 et la protéine TWIST1 se fixe de manière synergique à la protéine BRD4 (Shi et al., 2014). Cette interaction entre les protéines TWIST1 et BRD4 est notamment nécessaire à la transcription du gène cible *WINT5A*. Plus encore, l'inhibition de leur interaction conduit à une diminution significative du potentiel tumorigène de la protéine TWIST1 dans des lignées tumorales mammaires du sous-type basal-like (Shi et al., 2014).

## **II. Fonctions de la protéine TWIST1 dans le développement embryonnaire.**

Les fonctions assurées par les protéines TWIST ont été, à l'origine, mises en évidence par des approches génétiques. Chez la Drosophile, la délétion du gène ancestral *Twist* altère la mise en place du mésoderme au cours de la gastrulation et s'accompagne de l'absence complète de viscères conduisant à une torsion de l'abdomen, d'où le nom de Twist (Simpson, 1983; Thisse et al., 1987). Chez la souris, la délétion des deux allèles du gène *Twist1* n'affecte pas la gastrulation mais reste létale au niveau embryonnaire (E11.5) du fait d'altérations au niveau de la formation des somites et de la fermeture du tube neural (Chen and Behringer, 1995). Les souris *Twist1* hétérozygotes présentent, quant à elles, une polydactylie et une craniosynostose (Bourgeois et al., 1998; el Ghouzzi et al., 1997), un phénotype similaire à celui de patients atteints du syndrome de Saethre-Chotzen (Firulli et al., 2007; el Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997). Plus de cinquante mutations intragéniques hétérozygotes, touchant toutes le domaine bHLH de la protéine TWIST1, ont déjà été décrites chez ces patients (Bouard et al., 2013; el Ghouzzi et al., 1997; Gripp et al., 2000a).

Basée sur l'observation du phénotype des modèles murins déplétés en *Twist1*, Lee et collaborateurs ont émis l'hypothèse d'une régulation de la différenciation des précurseurs ostéogéniques par la protéine TWIST1 (Lee et al., 1999). Par la suite, les travaux de Yousfi et collaborateurs ont permis de mettre en évidence l'interaction entre les facteurs de transcription TWIST1 et RUNX2 dans le processus de maturation des ostéoblastes (Komori et al., 1997; Yousfi et al., 2002a). Ce phénotype est également associé à une dérégulation de la balance entre

complexes TWIST1 homodimérique et hétérodimérique (en association aux protéines E2A) au profit de l'homodimère menant à une différenciation exacerbée des ostéoblastes et à une suture prématurée des os du crâne (Connerney et al., 2006, 2008). Il reste néanmoins à identifier la nature des complexes TWIST1-RUNX2. Il est en effet possible que la fixation de RUNX2 soit dépendante de l'homodimérisation préalable de TWIST1. Il est également envisageable que la dimérisation ne soit pas un prérequis et que la protéine RUNX2 forme un dimère à part entière avec la protéine TWIST1.

Au cours du développement, le gène *TWIST2* présente un profil d'expression tissulaire proche mais distinct du gène *TWIST1* (Li et al., 1995). La délétion des deux allèles du gène *Twist2* n'impacte pas le développement embryonnaire de souris (Li et al., 1995). Cependant les nouveau-nés meurent dans les premiers jours à la suite d'une cachexie sévère induite par une production anormalement élevée de cytokines pro-inflammatoires (Šošić et al., 2003). Notons que ces souris présentent des anomalies oculaires et des lésions bitemporales également rencontrées chez des patients atteints du syndrome de Seitleis pour lesquels des mutations homozygotes non-sens de *TWIST2* ont été identifiées (Tukel et al., 2010). Ces données suggèrent que, malgré leur homologie de séquence, les deux protéines possèdent des fonctions distinctes au cours du développement (Franco et al., 2011). Néanmoins, les souris double-hétérozygotes *Twist1* et *Twist2* présentent un phénotype semblable aux souris déplétées en TWIST2, confirmant ainsi la redondance de certaines de leurs fonctions (Šošić et al., 2003).

### III. Fonctions post-natales de la protéine TWIST1.

Au cours du développement, les inducteurs d'EMT, dont les gènes *TWIST*, possèdent des profils d'expression spatio-temporels définis et limités. A la naissance, la plupart de ces protéines sont indétectables et leur expression chez les adultes se limite à quelques précurseurs de tissus d'origine mésodermique (Isenmann et al., 2009). Le gène *TWIST1* est exprimé notamment au niveau du placenta, du cœur et des muscles striés squelettiques (Wang et al., 1997) où il joue le rôle d'inhibiteur de la différenciation myoblastique (Leshem et al., 2000). Son expression est également retrouvée dans les odontoblastes où il permet le maintien de l'homéostasie de ces cellules mésenchymateuses à l'origine de la dentine, constituant majeur de la dent (Galler et al., 2007). Le gène *TWIST1* se trouve, en outre, exprimé au niveau de la graisse brune, où il est essentiel à la régulation de la thermogenèse adaptative qui permet la métabolisation de la graisse en chaleur en inhibant le facteur de transcription PGC1 $\alpha$ . Concrètement, une surexpression de *TWIST1* au niveau des adipocytes conduit à l'inhibition de ce processus, aboutissant à une accumulation de graisse. A l'inverse, une haplo-insuffisance de *TWIST1* induit une résistance au diabète de type 2, dit diabète grasseux (Pan et al., 2009; Wallberg-Henriksson and Zierath, 2009).

La protéine TWIST1 est également détectée dans les lymphocytes T « helpers 1 » LTH1 dits lymphocytes auxiliaires. Concrètement, il a été montré que le taux de protéine dans les LTH1 augmente en fonction du nombre de stimulations antigéniques reçues par les lymphocytes. Cette augmentation corrèle avec une diminution des cytokines normalement produites et sécrétées par ces LTH1 (TNF- $\beta$ , IL-2 et IFN- $\gamma$ ) en réponse à une stimulation antigénique (Niesner et al., 2008; Pham et al., 2012). Parallèlement, la protéine TWIST1 diminue l'expression de chémokines pro-inflammatoires ainsi que de leurs récepteurs tout en inhibant la transduction des signaux en aval (Niesner et al., 2008). En cela, le facteur de transcription TWIST1 se comporte comme un facteur limitant la réponse pro-inflammatoire des LTH1 en réponse à leur activation.

En ce qui concerne le gène *TWIST2*, il existe à ce jour très peu de travaux étudiant son expression dans les tissus adultes sains. La protéine a été identifiée dans les progéniteurs myéloïdes où elle inhibe leur prolifération ainsi que leur maturation (Sharabi et al., 2008). Au niveau des cellules myéloïdes matures, la protéine TWIST2 inhibe la production de cytokines

pro-inflammatoires telles que l'IL-12, tout en favorisant la production de cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-4 et l'IL-10 (Sharabi et al., 2008). Notons que chez la souris, la protéine TWIST2 a également été détectée dans le derme (Li et al., 1995).

## **IV. Pathologies associées à une perte d'expression des gènes TWIST**

### **IV.1. Syndrome de Saethre-Chotzen**

Mis en évidence dès 1931 par le neuropsychiatre norvégien H. Saethre et le pédiatre allemand F. Chotzen, le syndrome éponyme se définit comme une Acrocéphalosyndactylie de type brachycéphalie par synostose de la suture coronale. Le diagnostic repose principalement sur la présence de constatations cliniques caractéristiques. Les manifestations majeures se caractérisent par une déformation crânienne asymétrique, un front proéminent, des oreilles petites, rondes et présentant une déformation caractéristique du pavillon. On observe également un hypertélorisme (augmentation de distance entre deux organes ou parties du corps) associé à un ptosis (chute de la paupière supérieure) uni- ou bilatéral, un strabisme ainsi que des anomalies des voies lacrymales. L'hypertension intracrânienne, liée à la craniosténose, est responsable d'une atrophie optique et d'une surdité. Les symptômes ne se limitent pas à des altérations faciales. On observe également une syndactylie (fusion de la peau voire des os composant les doigts) souvent partielle ainsi que diverses altérations osseuses dactylaires. Bien que plusieurs symptômes, comme la syndactylie dite II-III (de l'index et du majeur) sont caractéristiques du syndrome de Saethre-Chotzen (SSC), le diagnostic différentiel inclut d'autres formes syndromiques de craniosténose comme Muenke, Baller-Gerold, Pfeiffer, et le syndrome de Crouzon. Il n'existe pas de traitement curatif mais simplement symptomatique qui consiste en une cranioplastie "d'avancement du visage" (ajustement des "monoblocs" de Lefort I, II ou III) et d'ajustement des plaques crâniennes. Ces opérations nécessitant en général un mois d'hospitalisation puis six mois de port de broches appelées "distracteurs" permettent le rétablissement d'un volume intracrâniale ainsi que d'une morphologie correcte, limitant ainsi le risque de retard mental. D'un point de vue étiologique, cette malformation autosomique dominante (prévalence 1 sur 25 000 à 50 000) est majoritairement due à une altération du gène

*TWIST1*, que ce soit suite à une délétion de son locus 7p21.1 ou en réponse à des mutations associées à une perte de fonction. De manière logique, on observe des phénotypes hautement similaires lors de la mutation des facteurs de transcription *TCF12* (HEB) et *FGFR2*. Dans la pratique médicale de tous les jours, le dépistage prénatal pour une mutation *TWIST1* est rare, mais peut être réalisée dans les familles ayant une mutation connue ou lorsque l'échographie montre une craniosténose d'étiologie inconnue. Dans la plupart des cas, lorsque le cas est pris en charge et traité précocement, le pronostic est excellent. Etant donné les propriétés tumorales de la protéine TWIST1, certains laboratoires ont essayé d'établir une corrélation entre le SSC et l'augmentation du risque de développer un cancer. Une première étude suédoise a été réalisée sur quinze familles ayant des membres féminins atteints du SSC. Cette étude stipule que sur 29 cas analysés, 15 (soit 52%) ont développé un cancer du sein après l'âge de 25 ans, quatre avant 40 ans, et cinq entre 40 et 50 ans. Le nombre de cas observés (n=15) est, d'après ces travaux, significativement supérieur au chiffre attendu dans la population générale de cette tranche d'âge (n=0.89). Sahlin et collaborateurs concluent donc qu'une femme atteinte du SSC a une probabilité plus élevée de développer un cancer du sein (Sahlin et al., 2007). Cependant, une étude australienne infirme l'existence d'une telle corrélation sur une cohorte plus importante (James et al., 2009). Un certain nombre de données *in vitro*, dont certains présentés dans ce manuscrit (développés dans la partie « Résultats »), soutiennent l'étude australienne. Contrairement au SSC où l'haploinsuffisance ou des mutations du gène *TWIST1* affecte le développement, la surexpression de la protéine est associée à plusieurs types de cancers. Dans nombreuses de ces cellules cancéreuses, la déplétion en TWIST1 inhibe la prolifération et réduit leurs potentiels transformants et métastatiques (Ansieau et al., 2008; Burns et al., 2013; Shi et al., 2014; Tran et al., 2012). Malgré ces résultats *in vitro*, il existe deux rapports de malignité associée à une mutation du gène *TWIST1* dans le SSC. Dans le premier cas, un carcinome nasopharyngé a été détecté chez une personne de 32 ans atteinte d'un SSC (McKeen et al., 1984). Toutefois, trois individus appartenant à la même fratrie n'étant pas atteint par le SSC ont également été diagnostiqués avec un cancer, réduisant ainsi la probabilité d'une corrélation entre SSC et tumorigénèse. Le deuxième rapport ne comportait qu'un seul individu présentant un SSC ainsi qu'un carcinome rénal à l'âge de 5 ans (Seifert et al., 2006). Fait intéressant, les deux mutations du gène *TWIST1* associées au SSC sont effectivement retrouvées dans les lignées germinales alors que l'allèle sauvage a été apparemment conservé dans le tissu tumoral.

## **IV.2. Syndrome de Setleis**

Le syndrome de Setleis, encore appelé dysplasie dermique faciale focale de type III (FFDD3) a été décrit pour la première fois par le pédiatre Américain H. Setleis lors de l'étude d'une famille consanguine Portoricaine en 1963 (Setleis et al., 1963). Cette pathologie se caractérise par un faciès spécifique dit léonin (ressemblant à un lion), des lésions bitemporales faisant penser à des marques de forceps ainsi qu'un excédent de peau au niveau du visage donnant une impression de gonflement. Les anomalies structurelles du nez sont très fréquentes avec un allongement du septum au-delà des ailes nasales. Dans la plupart des cas, les enfants atteints du syndrome de Setleis arborent un pincement des lèvres mais également des anomalies des cils, tels qu'une distichiasse (plusieurs rangées de cils sur les paupières supérieures) pouvant conduire à une irritation de la cornée si les cils se trouvent sur la face interne de la paupière, ou encore une absence de cils sur la paupière inférieure et/ou supérieure (astichiasse). L'absence des glandes de Meibomius augmente, en outre, le risque d'infections (conjonctivite ou blépharite). S'ajoute à cela des altérations de la vision : nystagmus, exotropie et strabisme. Ce syndrome peut malheureusement être associé à des difficultés d'apprentissage, des problèmes de comportement voire un handicap intellectuel sévère. Lorsque c'est le cas, on observe généralement des défaillances de divers organes, réduisant fortement la durée de vie des patients. D'un point de vue thérapeutique, les anomalies nasales, labiales et oculaires peuvent être corrigées chirurgicalement, les interventions en chirurgie plastique restant limitées. Dans les cas les plus graves, le traitement ne peut être que symptomatique. Le mode de transmission du syndrome de Setleis n'est pas clairement établi. En effet, certaines études le caractérisent comme étant autosomique récessif, alors que d'autres le définissent comme dominant (al-Gazali and al-Talabani, 1996). De manière générale, la pénétrance diminue dans les familles lorsqu'aucun parent ne présente de symptômes où que l'un des parents présente une dysmorphie faciale légère. Ces différents rapports suggèrent que le syndrome de Setleis est génétiquement hétérogène, reflétant probablement la nature interactive des anomalies génétiques sous-jacentes, ce qui pourrait expliquer la difficulté d'identification du mode de transmission. Dans la littérature médicale contemporaine, il n'existe qu'une vingtaine de cas répertoriés, répartis dans une quinzaine de familles, parmi lesquelles seulement quatre présentent des mutations du gène *TWIST2* (Tukel et al., 2010). La majorité des patients atteints ne présentant pas ces mutations, ce

qui sous-entend l'existence de mécanismes moléculaires hétérogènes n'étant, pour l'heure, pas identifiés. Des études de séquençage du génome dans son intégralité des différents patients répertoriés et leur famille sont en cours afin de déterminer la causalité de ces phénotypes.

## **V. Propriétés pro-métastatiques et oncogéniques des protéines TWIST**

### **V.1. III.1 Réactivation des gènes TWIST dans les cancers**

Les prémices du rôle des protéines TWIST dans la progression tumorale font suite à l'observation de la réactivation des deux gènes de manière fréquente dans des conditions pathologiques, en particulier dans de nombreux cancers incluant différents types de carcinomes, des sarcomes, des mélanomes, des gliomes et des neuroblastomes (Ansieau et al., 2010; Puisieux et al., 2006). Peu d'altérations génétiques sont connues pour être à la base de l'induction de gènes embryonnaires et en particulier du gène *TWIST1*. Tout au plus peut-on citer une amplification d'une région chromosomique incluant le gène *TWIST1* dans des carcinomes de poumon à petites cellules (Pallier et al., 2012). Plus récemment, le groupe de Roberta Maestro a également montré à l'aide de marquage FISH, un gain en nombre de copie du locus contenant le gène *TWIST1* dans des sarcomes (Piccinin et al., 2012). L'activation du gène est connue pour être induite directement en réponse à des activations oncogéniques, tels que l'amplification du gène N-MYC dans le neuroblastome ou encore la mutation du gène K-RAS dans le pancréas, (Lee and Barsagi, 2010; Selmi et al., 2014; Valsesia-Wittmann et al., 2004), en réponse à divers stress (hypoxie, compression mécanique), ou encore suite à une activation aberrante de multiples voies de signalisation (Ansieau et al. Oncogene 2010).



## **V.2. Propriétés pro-métastatiques**

En lien avec leur capacité à promouvoir l'EMT, la protéine TWIST1 est dotée d'un potentiel pro-métastatique comme l'attestent les travaux du groupe du Dr. Weinberg (Yang et al., 2004). Il y a été montré que la présence de la protéine TWIST1 dans des lignées tumorales mammaires murines isogéniques corrélait avec une dissémination métastatique élevée. A l'inverse, l'extinction de son expression par des approches d'ARN interférence, conduisait à l'inhibition du processus métastatique. Au vu de ces observations et du rôle de la protéine TWIST1 dans l'induction d'une EMT au niveau embryonnaire, les auteurs établissent un lien entre potentiel métastatique et capacité à induire une EMT (Onder et al., 2008; Yang et al., 2004). Des travaux récents ont permis de confirmer que la protéine TWIST1 favorise la formation d'invadopodes, protubérances membranaires spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Eckert et al., 2011). En accord avec ces observations, la détection de la protéine TWIST1 dans des tumeurs primaires humaines est associée à un risque élevé de développer des métastases (Martin et al., 2005; Watanabe et al., 2004; Yang and Weinberg, 2008). Récemment, ces observations ont été étendues à la protéine TWIST2 (Fang et al., 2011) (Fang *et al.*, 2011).

## **V.3. Propriétés oncogéniques**

L'activation des gènes embryonnaires *TWIST* présente d'autres effets délétères, en particulier celui d'inhiber les voies oncosuppressives dépendantes des protéines RB et p53 et de permettre ainsi aux cellules d'échapper à l'apoptose ou à la sénescence induites en réponse à des activations mitogéniques. Les premières suggestions de propriétés anti-apoptotiques des protéines TWIST remonte à 1995 lorsque la délétion des deux allèles du gène *Twist1* a été montrée comme responsable d'une augmentation massive de l'apoptose dans les somites au cours de l'embryogenèse (Chen and Behringer, 1995). Par la suite, l'haploinsuffisance de *TWIST1* observée chez des patients atteints du syndrome de Saethre-Chotzen révéla son rôle dans la régulation de l'apoptose des ostéoblastes crâniens (Yousfi et al., 2002b). Il doit cependant être noté que dans ces deux cas, l'apoptose observée est le résultat d'une différenciation prématurée n'impliquant pas directement ces voies oncosuppressives, les taux d'expression des protéines p53

(protéine totale ou phosphorylée) et RB ne variant pas (Yousfi et al., 2002b). Néanmoins, ces études ont permis de définir une des réponses biologiques majeures liées à l'expression de la protéine TWIST1.

La première preuve de ce concept dans un contexte tumoral parvint d'un criblage fonctionnel de protéines capables de contrecarrer l'apoptose induite en réponse à l'activation de l'oncogène *c-MYC* dans des fibroblastes de rat (Maestro et al., 1999). Outre son potentiel oncogénique, le facteur de transcription *c-MYC* constitue également un puissant inducteur d'apoptose (Evan et al., 1992). La transformation cellulaire par *c-MYC* nécessite donc la mise en place de mécanismes susceptibles de neutraliser son activité pro-apoptotique telle l'inactivation directe ou indirecte de gènes suppresseurs de tumeurs. L'analyse du mécanisme d'inactivation de l'apoptose induite en réponse à *c-MYC* par les gènes *TWIST* a permis de déterminer qu'il repose sur une inactivation de la voie oncosuppressive ARF-p53, conférant aux protéines TWIST une activité pro-oncogénique. Le laboratoire a ensuite confirmé cette activité anti-apoptotique dans le cadre de la neuroblastomagenèse en se basant sur l'aspect moléculaire de la pathologie. En effet, alors que l'amplification du gène *N-MYC* devrait sensibiliser les cellules à l'apoptose, les patients ayant un statut *N-MYC*-amplifié sont généralement de mauvais pronostic, malgré une chimiothérapie intensive (Brodeur, 2003). Bien que, la voie ARF/p53 représente le système de sauvegarde directement induit en réponse à une activation de *N-MYC*, les mutations du gène TP53 représentent des événements rares dans le cadre du neuroblastome (Vogan et al., 1993; Zindy et al., 1998). Le laboratoire a démontré que l'amplification du gène *N-MYC* conduit irrémédiablement à l'activation du gène *TWIST1*, ce dernier étant une cible transcriptionnelle de l'oncoprotéine (Selmi et al., 2014), protégeant ainsi les cellules contre l'effet pro-apoptotique de *N-MYC* par l'inhibition de la voie ARF/p53 (Valsesia-Wittmann et al., 2004). Toutefois, même si TWIST1 inhibe efficacement la pénétrance du phénotype apoptotique, l'application d'un stimulus apoptotique intense et prolongé permet d'outrepasser l'effet protectif du facteur embryonnaire (Maestro et al., 1999). Il a, en effet, été démontré que l'induction intense du phénomène d'apoptose s'accompagne d'une diminution drastique du taux de protéine TWIST1 sans pour autant affecter le niveau de son ARNm. Cela s'explique par la présence, dans la séquence primaire de la protéine TWIST1, d'un site de clivage de la caspase-3 (DELD). Les fragments de digestion sont hautement instables et subissent une dégradation médiée par le protéasome. L'abrogation de ce site par mutagenèse dirigée aboutie à l'inhibition de la dégradation de la

protéine TWIST1 ainsi qu'à une restauration de la pénétrance apoptotique (Demontis et al., 2006).

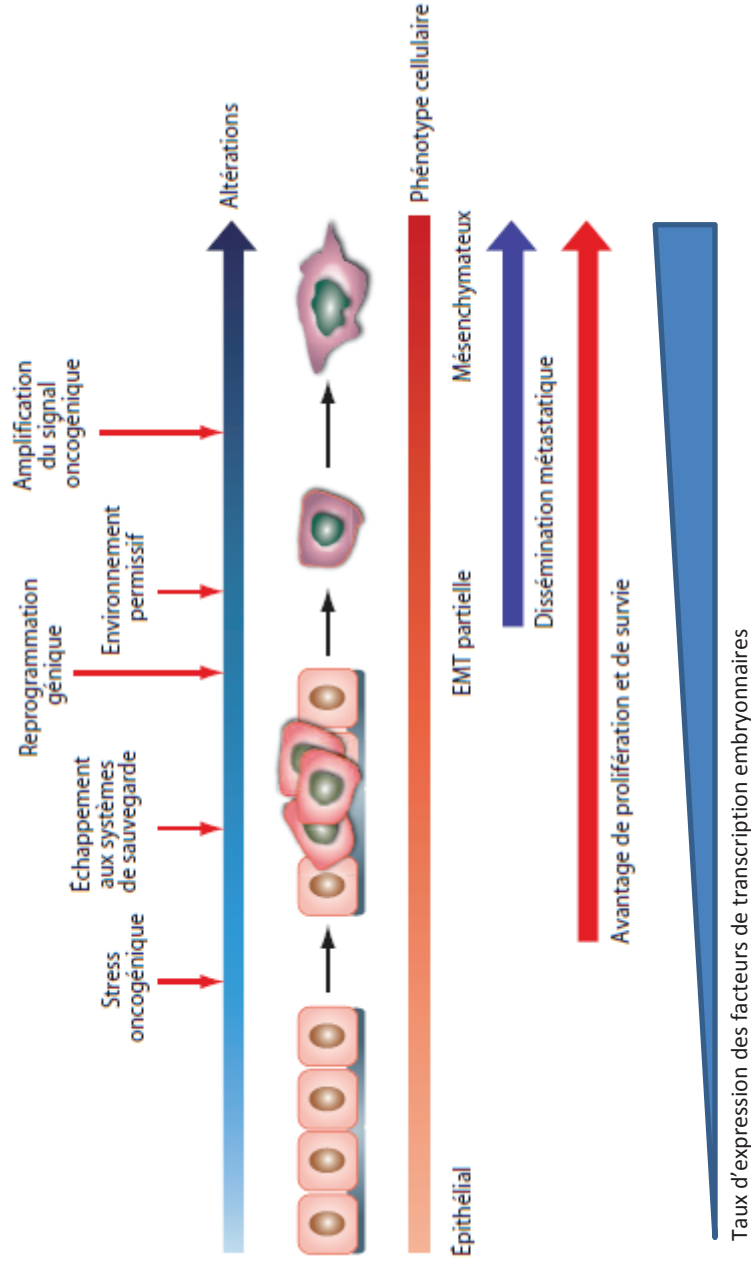
L'inactivation de la protéine p53 par les facteurs TWIST s'effectue à des niveaux multiples. La protéine TWIST interagit avec le facteur HOXA5, prévenant ainsi la transcription du gène *TP53*. Il intervient également lors de sa stabilisation par modifications post-traductionnelles en empêchant la phosphorylation du résidu Ser20, élément essentiel de l'activation de la protéine p53 en réponse à un stress génotoxique (Stasinopoulos et al., 2005). Parallèlement, la protéine embryonnaire TWIST1 est capable de séquestrer les acétyltransférases p300 et pCAF nécessaires à l'activité transactivatrice de la protéine p53 (Hamamori et al., 1999). Elle est également capable d'interagir directement avec la protéine p53 pour en moduler l'activité. En effet, il est capable de se fixer au domaine de liaison à l'ADN de la protéine, inhibant ainsi la transcription de ses gènes cibles (Shiota et al., 2008). Plus récemment, le groupe de R. Maestro a mis en exergue une interaction directe entre le domaine WR et les séquences carboxy-terminales de la protéine p53. Cette interaction a pour effet d'inhiber la phosphorylation du résidu Ser392, conduisant à une augmentation de l'affinité de p53 pour son répresseur MDM2, favorisant ainsi sa dégradation (Piccinin et al., 2012).

Au-delà de leurs propriétés anti-apoptotiques, les protéines TWIST facilitent également l'échappement au mécanisme de sénescence en réponse à divers stress génotoxiques (cisplatine et peroxyde d'hydrogène) comme l'ont montré Kwok et collègues en 2007 dans des lignées de prostate (Kwok et al., 2007). Parallèlement, notre laboratoire a démontré que les protéines TWIST permettent un échappement au mécanisme de sénescence en réponse à une activation mitogénique et représentent de ce fait des protéines de régulation majeures des principaux systèmes de sauvegarde cellulaire. Des expériences de coopération oncogénique ont été menées, dans un premier temps, dans des fibroblastes embryonnaires murins. A l'inverse de la famille MYC, l'expression d'oncogènes tels que RAS est davantage associée à l'induction du mécanisme de sénescence (Serrano et al., 1997; Trost et al., 2005). Les résultats ont montré que l'expression des protéines TWIST permet de neutraliser l'induction du programme de sénescence et coopère avec RAS dans la transformation néoplasique des cellules (Ansieau et al., 2008). L'analyse mécanistique tend à démontrer que les protéines TWIST répriment les voies oncosuppressives dépendantes des protéines p53 et RB en inhibant l'activité transcriptionnelle des gènes *CDKN2A*

et *CIP1*. Dans des lignées de carcinomes de poumon avec un statut RB1 et TP53 mutés, l'inhibition de l'expression de TWIST1 s'accompagne de l'engagement des cellules dans un programme de sénescence, suggérant que TWIST1 fonctionne par de multiples mécanismes restant à définir (Burns et al., 2013). On peut cependant noter la présence d'éléments cis-régulateurs potentiels (E-box) en amont du locus *INK4A/ARF/INK4B*, ce qui rend possible leur régulation par les FTE et donc l'inhibition de la sénescence (Ansieau et al., 2008; Burns et al., 2013; Hansson et al., 2003). De plus, des protéines membres de la famille des polycombs, telles que EZH2 et BMI1, sont connues pour inhiber l'expression des protéines codées par ce locus. Or, ces deux facteurs sont activés en présence de la protéine TWIST1, renforçant ainsi la régulation de ces inhibiteurs de cyclines-kinases par la protéine TWIST1 (Cakouros et al., 2012; Popov and Gil, 2010; Yang et al., 2010).

De manière intéressante, la déplétion de TWIST1 et/ou TWIST2 par des approches d'ARN interférence dans des lignées tumorales mammaires et de mélanomes ou de neuroblastomes conduit généralement à l'engagement des cellules dans un programme de sénescence ou leur mort, suggérant que de nombreuses lignées restent addictives aux protéines TWIST pour leur survie et prolifération (Valsesia-Wittman *et al.*, 2004 ; Ansieau *et al.*, 2008). Ces données ont été confirmées en opérant des tests de coopération oncogéniques *in vivo* entre protéines RAS et TWIST1 dans des cellules épithéliales de poumon (Tran et al., 2012). Par le biais de souris transgéniques, en utilisant une forme inductible du gène *Twist1*, l'expression du facteur de transcription embryonnaire a été confirmée comme étant capable de coopérer avec RAS dans le développement de tumeur et le maintien de son expression comme indispensable à la prolifération des cellules cancéreuses (Figure 24).

Par le biais de l'inhibition de ces systèmes de sauvegarde et l'induction du mécanisme d'EMT, les protéines TWIST favorisent la conversion de lésions pré-malignes en tumeurs malignes ainsi que la dissémination métastatique. Ces deux mécanismes ont été montrés comme étant potentiellement concomitants, dans des conditions permissives à l'EMT, dans des études *in vitro*. Des analyses immunohistochimiques ont démontrés la présence de la protéine TWIST1 au sein de lésions primaires de carcinomes mammaires à un stade précédent la dissémination métastatique (Morel et al., 2012). Dans le même temps, il a été montré que l'activation de la protéine ERBB2 dans les cellules mammaires de souris déclenche, sous la gouvernance de la



**Figure 24: Cheminement de la progression tumorale dépendante des facteurs de transcription embryonnaires.**

En favorisant l'échappement aux systèmes de sauvegarde cellulaires et en induisant des reprogrammations géniques, les facteurs de transcription embryonnaire favorisent la transformation maligne et accordent aux cellules des avantages de survie et de prolifération au cours des différentes phases de la progression tumorale. Ces fonctions se traduisent par l'engagement partiel des cellules dans un programme d'EMT (EMT partielle) avec le maintien d'une morphologie épithéliale. Adjoint à un environnement permissif lié à la production de cytokines par le stroma activé ou à l'amplification d'un signal mitotique (dans le cadre du mélanome), l'engagement dans le programme d'EMT est finalisé (EMT totale) et se traduit par l'acquisition de propriétés migratoires et invasives, conduisant à l'initiation de la cascade métastatique. En accord avec cette hypothèse, de récentes données ont démontré que les niveaux d'expression de ces facteurs de transcription embryonnaires conditionnaient leurs activités (Beck B. et al., *Cell Stem Cell* 2015 ;Liu Y. et al., *Nat. Commun.* 2014)

Figure issue de Ansieau S. & Jacquaroud L., *Thérapie Ciblée des cancers* 2013

protéine TWIST1, une dissémination de cellules pré-malignes à partir de tissu mammaire vers les poumons et la moelle osseuse avant même l'apparition de tumeurs mammaires (Hüsemann et al., 2008), corroborant ainsi les études de Podsypanina et collaborateurs, stipulant que des cellules épithéliales mammaires murines phénotypiquement saines, injectées dans le flux sanguin puissent survivre dans des sites ectopiques tels que les poumons, jusqu'à ce que l'expression d'oncogènes ne conduise à leur prolifération et la colonisation du site (Podsypanina et al., 2008).

## **VI. Régulation de l'activité de la protéine TWIST1.**

Une analyse comparative du taux d'ARNm et de l'expression de la protéine Twist1 dans des embryons de souris a montré une forte expression de l'ARN dans le mésoderme présomitique, les somites épithéliaux, et le mésoderme antérieur, sans pour autant que la protéine ne puisse être détectée (Gitelman, 1997). Ce delta de corrélation a également été noté au cours du développement embryonnaire plus tardif. En effet, le taux d'ARN atteint son plus haut niveau sept jours post-coïtum alors que celui de la protéine n'est pas atteint avant le neuvième jour. La différence de concordance entre l'expression de l'ARNm et celle de la protéine suggère donc que l'expression du gène *Twist1* est contrôlée au niveau post-transcriptionnel (Gitelman, 1997).

### **VI.1. Modifications post-traductionnelles et régulation de la stabilité de la protéine.**

Les régulations post-traductionnelles, dont les phosphorylations font partie, jouent un rôle de premier plan dans le contrôle fin de l'expression génique en permettant une modulation de la stabilité/activité des protéines dans le temps et l'espace, en fonction des besoins de la cellule. La protéine TWIST1 étant instable, le contrôle dynamique de sa stabilité constitue un mécanisme déterminant de la régulation de son activité. Des analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier le résidu Ser68 comme étant un site majeur de phosphorylation de la protéine

TWIST1. De manière intéressante, le taux de phosphorylation corrèle avec le niveau d'expression de la protéine dans différentes lignées tumorales mammaires. Par ailleurs, l'utilisation d'un mutant mimant son hypo-phosphorylation (S68A) accélère considérablement l'ubiquitination et la dégradation de la protéine. En effet, la demi-vie de la protéine dite sauvage est de 6,2 heures et n'est plus que de 1,8 heures pour le mutant S68A. La co-expression de l'ubiquitine avec le mutant S68A ou S68E augmente le degré d'ubiquitination (particulièrement évident en présence de MG132) de ces protéines par rapport à la protéine TWIST1 sauvage confirmant les précédentes observations. Ces mêmes travaux concluent que la phosphorylation se fait en réponse à l'activation de la voie des MAPK ou à un traitement au TGF- $\beta$ , stabilise la protéine en bloquant sa dégradation par le protéasome (Hong et al., 2011).

Le résidu Ser68 n'est pas le seul site de phosphorylation impliqué dans la stabilisation de la protéine TWIST1. En effet, la phosphorylation du résidu Ser42 par la protéine PI3K/PKB, permet également une stabilisation de la protéine TWIST1 (Vichalkovski et al., 2010). Cette stabilisation se retrouve lors de la phosphorylation des résidus Ser18 et Ser20 par la Caséine Kinase 2 (CK2) en réponse à l'interleukine-6 (Su et al., 2011).

La partie N-terminale de TWIST1 n'est pas la seule à intervenir dans sa stabilité. De manière opposée, la phosphorylation de la protéine TWIST1 par la protéine GSK3- $\beta$  au niveau du domaine WR, dans le modèle du xénope, conduit à une dégradation du facteur de transcription. L'effet de GSK3- $\beta$  passe a priori par une augmentation de l'affinité de Ppa, composante reconnaissant le substrat de l'ubiquitine ligase E3, pour le domaine WR de la protéine TWIST1, conduisant à sa dégradation (Lander et al., 2011). Bien que le domaine WR soit nécessaire à l'ubiquitination de la protéine, le domaine lui-même ne contient pas de résidus Lysine pouvant fonctionner comme sites accepteurs de fragments d'ubiquitine. Il semblerait que ce soit le résidu Lys175 juxtaposé au domaine WR qui soit la cible de l'ubiquitination, sa mutation induisant une stabilisation de la protéine (Qiang et al., 2014).

L'ubiquitination n'est pas la seule voie conduisant à la déplétion en TWIST1. Au-delà du protéasome, il existe un mécanisme de dégradation supplémentaire : l'autophagie. Tout comme pour la protéine p53, l'inhibition de l'autophagie augmente la stabilité de la protéine TWIST1, sans pour autant bloquer totalement la dégradation, suggérant une coopération possible entre autophagie et le protéasome. La protéine p62 a été démontrée comme étant une protéine



adaptatrice de l'autophagie qui agit comme un lien entre ubiquitination et autophagie. De plus, des analyses d'immunoprécipitation ont montré que p62 se fixait grâce à son domaine UBA (ubiquitin-associated domain) sur le domaine WR lorsque celui-ci est ubiquitinilé. La délétion du domaine UBA inhibe la capacité de p62 à interagir avec les molécules d'ubiquitine associées à TWIST1 (Qiang et al., 2014).

## **VI.2. Répercussions de la phosphorylation de la protéine TWIST1 sur son activité.**

La phosphorylation de TWIST1 n'agit pas seulement sur sa stabilité mais aussi sur sa capacité à interagir avec ses partenaires influant de fait à un autre niveau sur son activité. A l'origine, la phosphorégulation des FTE de la classe des bHLH a été étudiée en utilisant les protéines HAND comme modèle. Ces travaux ont mis en exergue un circuit de régulation impliquant la protéine kinase A (PKA) ou PKC ainsi que la sous-unité B56 $\delta$  de la phosphatase PP2A. L'utilisation de mutants de phosphorylation (hyper- et hypophosphorylés) a permis de démontrer l'importance du groupement phosphate dans l'affinité des protéines HAND pour ses partenaires de dimérisation (Firulli et al., 2003). Ces variations du statut de phosphorylation conduisent à des altérations de la morphogénèse dans des expérimentations *in vivo*. Les résidus impliqués dans ce processus sont hautement conservés au cours de l'évolution et sont retrouvés au niveau des protéines TWIST (Firulli and Conway, 2008). Des expériences de coimmunoprécipitation ont confirmé que la protéine TWIST murine est phosphorylable par la kinase PKA et interagit avec l'unité catalytique B56 $\delta$  de la phosphatase PP2A (Firulli et al., 2005). De manière intéressante, certaines mutations impliquées dans l'apparition du SSC sont adjacentes aux sites de fixation de la PKA et réduisent considérablement la phosphorylation des résidus Thr125 et Ser127. Certaines de ces mutations se trouvant dans le domaine basique de liaison à l'ADN et étant associées à des malformations, il est possible que les effets sur le développement résultent du seul changement dans la spécificité de liaison de l'ADN et non pas du statut de phosphorylation. Cela semble peu probable étant donné que ces mêmes mutations dans le modèle *C.elegans* n'abolissent pas la capacité de la protéine TWIST1 à se fixer à l'ADN (Corsi et al., 2002). En cela, les modifications post-traductionnelles des protéines HAND2 et TWIST1

impliquant la phosphorylase PKA et la phosphatase PP2A rendent plausible l'hypothèse selon laquelle l'état de phosphorylation contrôle l'activité de ces protéines. Par homologie, un des acides aminés majeurs de la protéine humaine semble être le résidu Ser123, la mutation de ce résidu conduisant au syndrome de Saethre Chotzen (Firulli et al., 2005). Les mutants hyperphosphorylés de cette sérine (S123D) récapitulent les interactions de la protéine sauvage avec E47 et HAND2, toutefois avec une affinité plus faible. Les mutants hypophosphorylés (S123A), pour leurs parts, possèdent un profil d'interaction distinct et favorisent la formation d'homodimères TWIST1. Exprimé *in vivo*, l'homodimère à l'inverse de l'hétérodimère s'accompagne d'un phénotype de type SSC (Firulli et al., 2005). Parallèlement, l'observation que cinq mutations ponctuelles apparaissant chez des patients atteints du SSC codent pour des protéines ayant un potentiel de phosphorylation réduit sachant que les variations du statut de phosphorylation conduisent à un bouleversement en terme de partenaires de dimérisation, semble valider l'hypothèse, selon laquelle la dimérisation et donc la fonction de TWIST1 est dépendante de son état de phosphorylation.

### **VI.3. Dimérisation : cas particulier de l'homodimère TWIST1-TWIST1 et de l'hétérodimère TWIST1-E12.**

Le choix du partenaire de dimérisation semble donc crucial dans la modulation de l'activité des FTE et plus particulièrement ceux de la famille des bHLH. Ce motif de dimérisation hélice-boucle-hélice a été identifié pour la première fois lors de l'étude des protéines E12 (Transcription Factor-3, TCF-3) et E47 (Immunoglobulin Transcription Factor-1, ITF1). Issues de l'épissage alternatif du gène E2A, ces protéines ont à l'origine été identifiées comme jouant un rôle majeur dans la lymphogenèse à la suite d'un criblage visant à identifier les protéines impliquées dans le contrôle de l'expression des chaînes lourdes des immunoglobulines et se fixant sur des motifs d'ADN particulier (E-Box) (Murre et al., 1989a, 1989b). Il existe une très forte homologie de séquence entre ces deux protéines qui diffère seulement et légèrement au niveau de leur bHLH, ce qui suppose une redondance fonctionnelle (Slattery et al., 2008).

Contrairement aux protéines TWIST qui appartiennent aux bHLH tissus spécifiques de classe II, les protéines E12 et E47 appartiennent à une classe ubiquitairement exprimée, la classe I. Il a depuis été montré que les bHLH de classe II étaient capables de former des homodimères ou encore de s'hétérodimériser avec les protéines E12/E47 de classe I. Ces dimères sont ensuite capable de fixer, par l'intermédiaire de leur domaine basique, les séquences consensus E-Box (Massari and Murre, 2000).

Pour rappel, les travaux de Firulli et collaborateurs ont mis en évidence des différences phénotypiques lors de l'expression de l'homodimère TWIST1-TWIST1 ou de l'hétérodimère TWIST1-E12 *in vivo* (Firulli et al., 2005). De manière intéressante, dans le modèle de la Drosophile, l'expression de l'homodimère ne permet pas de compenser totalement les altérations phénotypes des individus portant une délétion complète du gène *Twist* ce qui implique l'existence d'autres complexes fonctionnelle, dont T1E12 (Castanon et al., 2001; Spicer et al., 1996). Or, E12/E47 ayant des fonctions propres, on se doit de se poser la question suivante : Le complexe T1E12 a-t-il une activité en soi ou est-elle simplement basée sur la capacité de la protéine TWIST1 à titrer E12/E47 et ainsi inhiber l'activité que ces protéines peuvent avoir par ailleurs ? Il est vrai que la protéine TWIST est capable d'inhiber la myogenèse en titrant le facteur E12, l'empêchant de former des dimères avec d'autres bHLH telles que MyoD (Hamamori et al., 1997; Hebrok et al., 1994; Spicer et al., 1996). Parallèlement, le laboratoire de James Cross a récemment souligné le rôle dominant de l'homodimère HAND1 au cours du développement de la souris, restreignant la fonction d'hétérodimère à un rôle de contrebalancement de l'activité de HAND1 *in vivo* (Hu et al., 2013). Cependant, la dimérisation des protéines TWIST1 et E12 ne se limite pas à un effet de titration. En effet, l'expression des deux monomères séparément n'est pas en mesure d'activer significativement un rapporteur contenant le promoteur d'un gène cible de *Twi* chez la Drosophile. La coexpression des deux protéines résulte, pour sa part, en une activation du rapporteur démontrant la nécessité, pour la transactivation, de la dimérisation de *Twi* avec son partenaire E12 (Laursen et al., 2007).

Il semble donc que la balance entre homodimère TT et hétérodimère TE soit cruciale dans la régulation de l'activité de la protéine TWIST1. Le phénomène de fusion des plaques crânielles lors du développement embryonnaire illustre parfaitement cette dualité. L'expression des protéines TWIST1 et E12 est constante tout au long de la suture crânienne (Funato et al., 2001;

Johnson et al., 2000; Rice et al., 2000). Dans cet environnement, on observe également l'expression des protéines Id, HLH de la classe III, au niveau des fronts ostéogéniques. Cette classe de protéine a la particularité d'être dépourvue de domaine basique de liaison à l'ADN et est connue pour se lier spécifiquement aux protéines E empêchant ainsi la transactivation de leurs gènes cibles/leur liaison à l'ADN (Kee, 2009). Ainsi la concentration relative des différents acteurs conditionne les dimères formés. Ainsi, au niveau des fronts ostéogéniques, les protéines Id titrant les protéines E, on observe la formation de l'homodimère TT qui induit la différenciation des ostéoblastes. Au niveau du mésenchyme, les protéines Id n'étant pas exprimé, la protéine E12 se retrouve libre de former l'hétérodimère T1E12 qui, pour sa part, conduit à la dédifférenciation ostéogénique (Connerney et al., 2006, 2008). Les deux dimères possèdent donc des effets différents voire même antagonistes. Par conséquent, le rapport TT versus TE dans une cellule est déterminant pour définir les propriétés fonctionnelles de la protéine TWIST1. En effet, un déséquilibre de la balance en faveur de TT conduit à une craniosynostose, définie par la fusion prématurée du crâne en raison d'une surdifférenciation des ostéoblastes. Au contraire, une augmentation du ratio en faveur du TE induira un retard dans la fusion des fontanelles osseuses. L'équilibre de la concentration relative de la protéine TWIST1 semble donc être primordial, comme en attestent les répercussions de l'haploinsuffisance du gène *TWIST* ou encore celles de plus de 50 mutations conduisant à une perte de fonction, ces deux types d'altérations étant associés au phénotype du SSC (Bourgeois et al., 1998; el Ghouzzi et al., 1997; Gripp et al., 2000a). A l'inverse, la trisomie du locus 7p15.3 contenant TWIST1 observée chez une famille de patients conduit à un cranium bifidum se caractérisant par un hiatus dans la voute crânienne (Stankiewicz et al., 2001). Ces deux phénotypes cliniques opposés, illustrent une nouvelle fois l'importance d'une régulation stricte de l'expression TWIST1.

## **4ème partie : Les Résultats.**

Les facteurs de transcription embryonnaires de la famille TWIST sont capables d'abolir l'activation des voies dépendantes des protéines RB et p53, activées en réponse à une activation oncogénique, d'inhiber ainsi les systèmes de sauvegarde cellulaires et de coopérer en conséquence avec des protéines mitogéniques de type RAS ou ERBB2 dans la transformation néoplasique. En cela, les protéines TWIST conduisent à l'émergence d'une population cellulaire bénéficiant d'avantages sélectifs de prolifération et de survie (Ansieau et al., 2008). Ils favorisent par ce biais la transformation cellulaire et la croissance tumorale et accordent également aux cellules des résistances à divers molécules thérapeutiques. Dans une large proportion de lignées cancéreuses, quelles que soient leur origine, l'inhibition de l'expression du gène *TWIST1* conduit à l'entrée des cellules en sénescence ou apoptose (Ansieau et al., 2008; Burns et al., 2013; Tran et al., 2012; Valsesia-Wittmann et al., 2004). Les cellules cancéreuses restent donc dépendantes de l'expression de *TWIST1* pour leur survie et leur prolifération malgré la présence et la redondance fonctionnelle d'autres facteurs de transcription embryonnaires tels que les membres des familles ZEB et SNAIL. A ce titre, la protéine TWIST1 constitue une cible thérapeutique potentielle. Au-delà de ses propriétés oncogéniques, le facteur de transcription embryonnaire est également capable de promouvoir l'engagement des cellules dans un programme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est communément associée à l'initiation de la cascade métastatique (Thiery et al., 2009). Elle facilite, par ailleurs, la transformation néoplasique des cellules et leur octroie certaines propriétés de cellules souches (Morel et al., 2008, 2012). Sur la base de ces observations, le laboratoire cherche à identifier des inhibiteurs spécifiques de la protéine TWIST1 puis à évaluer leur efficacité dans l'éradication de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, l'analyse des propriétés de la protéine TWIST1 au cours du développement embryonnaire a permis de montrer sa participation à différents complexes fonctionnels distincts sous la forme homodimérique (complexe T-T) ou hétérodimériques en association avec les protéines bHLH, E2A et Hand , (Connerney et al., 2006, 2008). Cibler la protéine TWIST1 requiert donc au préalable de définir la contribution relative de ces complexes au regard de la transformation néoplasique, une question que nous avons abordé dans un premier modèle, celui de la carcinogénèse mammaire.

Dans ce manuscrit, nous démontrons par le biais de dimères forcés que toutes les propriétés oncogéniques de la protéine TWIST1, telles qu'évaluées par le biais de nombreux tests *in vitro*

(tests de complémentation, inhibition de la sénescence oncogénique, induction de l'EMT et tests de coopération oncogénique...), sont spécifiquement attribués au complexe TWIST1-E12. L'insertion de mutations ponctuelles, définies d'après l'analyse de modèles de simulation *in silico* développés au sein du laboratoire (Bouard et al., 2013) et perturbant la dimérisation du complexe ou encore son interaction avec l'ADN conduit à une perte complète de l'activité, validant l'importance des deux partenaires dans l'activité oncogénique de la protéine de fusion. La détection du complexe TWIST1-E12 dans des carcinomes mammaires canauxaires *in situ* humains, récapitulant les phases précoces de l'initiation tumorale, par la technique de Proximity Ligation Assay (PLA) ainsi que la sensibilité accrue de souris transgéniques à développer des carcinomes mammaires lorsque le complexe hétérodimérique est exprimé dans les cellules épithéliales luminales mammaires, renforce la conclusion que le complexe TWIST1-E12 est la (ou l'une des) forme(s) active(s) de la protéine TWIST1 dans le cadre de la carcinogenèse mammaire.



## **I. Manuscrit de l'article**

**The heterodimeric TWIST1-E12 complex drives the oncogenic potential of TWIST1 in human mammary epithelial cells.**

Laurent Jacqueroud<sup>1,2,3,4,5</sup>, Charlotte Bouard<sup>1,2,3,4,5</sup>, Geoffrey Richard<sup>1,2,3,4,5</sup>, Mojgan Devouassoux-Shisheboran<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>, Raphael Terreux<sup>6,9,10</sup>, Audrey Pierrot<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Douglas B. Spicer<sup>11</sup>, Julie Caramel<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Léa Payen<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>, Alain Puisieux<sup>1,2,3,4,5,6,12</sup>, Agnès Tissier<sup>1,2,3,4,5</sup>, Stéphane Ansieau<sup>1,2,3,4,5,\*</sup>.

1. Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France ; 2. CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France ; 3. LabEX DEVweCAN, Lyon, France ; 4. UNIV UMR1052, Lyon, France ; 5. Centre Léon Bérard, Lyon, France, 6. Université de Lyon1, ISPB, Lyon, France ; 7. Hospices Civils de Lyon, Lyon, France ; 8. Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France, 9. Institut de Biochimie des protéines (IBCP, Lyon, France ; 10. CNRS UMR 5086, Lyon, France; 11. Center for Molecular Medicine, Main Medical Center Research Institute, Scarborough, Maine, USA ; 12. Institut Universitaire de France, Paris, France.

\* Correspondence: [stephane.ansieau@lyon.unicancer.fr](mailto:stephane.ansieau@lyon.unicancer.fr)

**Abstract (limited to 200 words)**

While the functions of both TWIST1 homodimeric and heterodimeric complexes during embryonic development have been deciphered, their relative contribution to the oncogenic potential of TWIST1 remained unaddressed. Using tethered dimers, we demonstrate that the heterodimeric TWIST1-E12 complex, unlike its TWIST1-TWIST1 counterpart, complements the endogenous functions of TWIST1 in sustaining breast cancer cell proliferation through inhibition of latent oncogene-induced senescence. Consistent with this observation, the heterodimer is the unique TWIST1 complex successfully overriding HRAS<sup>G12V</sup>-induced senescence. Furthermore, TWIST1-E12 turns out to be the only TWIST1 complex to trigger a partial epithelial-to-mesenchymal transition in human mammary epithelial cells, thereby facilitating their neoplastic transformation by RAS. Disruption of the interaction between the two partners or destabilization of the DNA/protein complex, achieved through insertion of punctual mutations selected on the basis of an *in silico* structural analysis developed in the laboratory, was confirmed to abolish the oncogenic potential of this heterodimer. Furthermore, in support of our conclusions, the TWIST1-E12 complex was confirmed to be detectable in human breast premalignant lesions and to afford mice an exacerbated susceptibility to spontaneously develop breast carcinoma, when aberrantly produced in mammary luminal cells. The TWIST1-E12 heterodimeric complex thus constitutes the oncogenic form of TWIST1 during breast carcinogenesis.

**Running title:** TWIST1 dimers and breast carcinogenesis.

**Key words:** TWIST1 dimers, escape from fail-safe programs, tumor initiation, breast.

## Introduction

The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a latent transdifferentiation process transiently converting epithelial cells into mesenchymal cells to promote cell migration. Essential for both morphogenesis and organogenesis during embryonic development, its aberrant activation at the invasive front of tumors constitutes one of the reported mechanisms initiating the metastatic cascade (1, 2). Regulated through a complex interactome of miRNAs and transcription factors (EMT-TFs) of the Snail, Twist and Zeb families (3), EMT actually plays a pivotal role in all metastatic steps, with secondary site colonization being the only exception requiring a return to an epithelial phenotype (MET process) (4, 5). Cell commitment into EMT was additionally demonstrated to facilitate the neoplastic transformation of human mammary epithelial cells (6). Although still partially defined, the oncogenic potential of EMT-TFs relies on their ability to genetically reprogram cells, with numerous consequences on mitogenic (such as the activation of the RAS pathway (7)) and oncosuppressive (such as the down-modulation of the phosphatase PP2A (6)) pathways and on cell metabolism (8). The genetic reprogramming furthermore associates with cell dedifferentiation and the subsequent reacquisition of some stemness properties (9, 10). The EMT-TF-driven dedifferentiation does not only contribute to carcinoma but also to melanoma and very likely to sarcoma development (11, 12), underlying its pivotal role in their oncogenic functions. TWIST proteins were additionally shown to facilitate the escape from fail-safe programs (senescence and apoptosis) and thereby to cooperate with mitogenic oncoproteins in promoting cell transformation *in vitro* and breast and lung carcinogenesis *in vivo* (6, 13-16). TWIST1 was found to directly bind to p53 and consequently destabilize the oncosuppressive protein (17). It additionally attenuates the transcriptional activation of numerous cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) in response to a mitogenic activation (15, 18). Interestingly, numerous cancer cell types remain dependent of TWIST1 for

their proliferation and survival *in vitro* (14, 15, 18-20). In support of this assumption, using a switchable *Twist1* transgenic mouse model, silencing *Twist1* expression was demonstrated to have a pronounced cytostatic effect on RAS + TWIST1-driven lung carcinomas through reactivation of a senescence program (16). Inactivation of the TWIST1 embryonic transcription factor might thus constitute a novel therapeutic route to restore senescence in tumors (21, 22).

The TWIST1 protein either forms homodimeric or heterodimeric complexes mainly in association with their HAND and E2A partners. Homo- and heterodimeric complexes were shown to display distinct and sometimes even antagonistic functions during embryonic development (23-25). Their respective contribution to the oncogenic potential of the embryonic transcription factor has yet never been addressed. To achieve this end we employed forced dimers, a strategy previously employed with success to decipher TWIST1 dimer function during embryonic development (23, 24). By combining complementary *in vitro* and *in vivo* functional assays, we demonstrated that the heterodimeric TWIST1-E12 complex drives the oncogenic potential of TWIST1 in human mammary epithelial cells. The need for efficient partner interaction and protein-DNA stability was confirmed by substituting specific residues that were previously reported to be essential for dimerization or to be targeted for post-translation regulation (26, 27), and through structural/functional analysis these were demonstrated to deeply impact TWIST1 complex functionality.

## Results

**The TWIST1-E12 heterodimeric complex, unlike the homodimeric TWIST1 complex, complements the loss of endogenous TWIST1 protein in sustaining mammary epithelial cancer cell proliferation.**

We previously reported that TWIST1 was critical to prevent oncogene-induced senescence (OIS) in breast cancer cells (15). We extended this observation to the luminal BT474 breast cancer cell line and the basal B/ claudin-low MDA-MB-436 and Hs578T breast cancer cell lines by demonstrating that the depletion of TWIST1, achieved through RNA interference, invariably associated with a proliferation arrest and triggered a senescence program, as assessed by crystal violet and SA- $\beta$ -galactosidase assays. The permanent growth-arrest associated with an accumulation of p21<sup>CIP1</sup> and p15<sup>INK4B</sup> cyclin-dependent kinase inhibitors, p16<sup>INK4A</sup> conversely remaining undetectable (Fig. 1A and Supplementary Fig.1). No trace of cleaved caspases-3 or PARP fragments were detected, excluding concomitant apoptosis induction (data not shown). As anticipated, survival and proliferation of MDA-MB-231 cells with residual endogenous *TWIST1* expression was confirmed to be TWIST1-independent (Supplementary Fig. 1). To evaluate the contribution of both the homodimeric and heterodimeric TWIST1 complexes in inhibiting latent OIS, complementation assays were performed with either TWIST1 or TWIST1 tethered dimers. This fusion protein strategy was successfully employed to delineate the functions of TWIST1 complexes during mouse embryonic development (23, 25, 28). As both *HAND1* and *HAND2* RNAs were undetectable in all three TWIST1-dependent cell lines (Supplementary Fig. 2A) and as the *TCF3* translation products, E12 and E47, are functionally redundant, fusion proteins were generated with human TWIST1 and/or E12 proteins (Supplementary Fig. 2B). The correct nuclear sub-localization of the two fusion proteins was confirmed (Supplementary Fig. 2C).

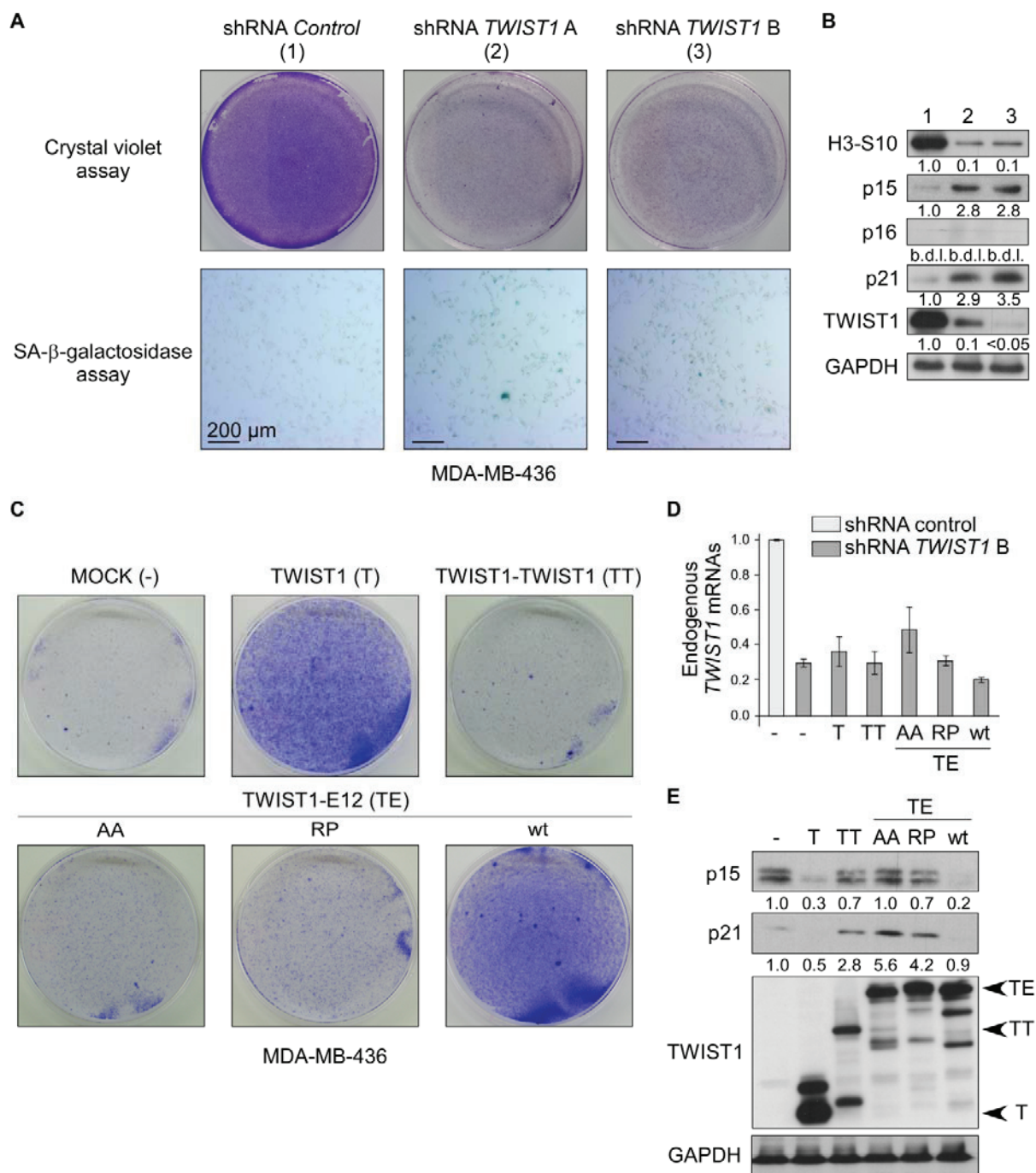


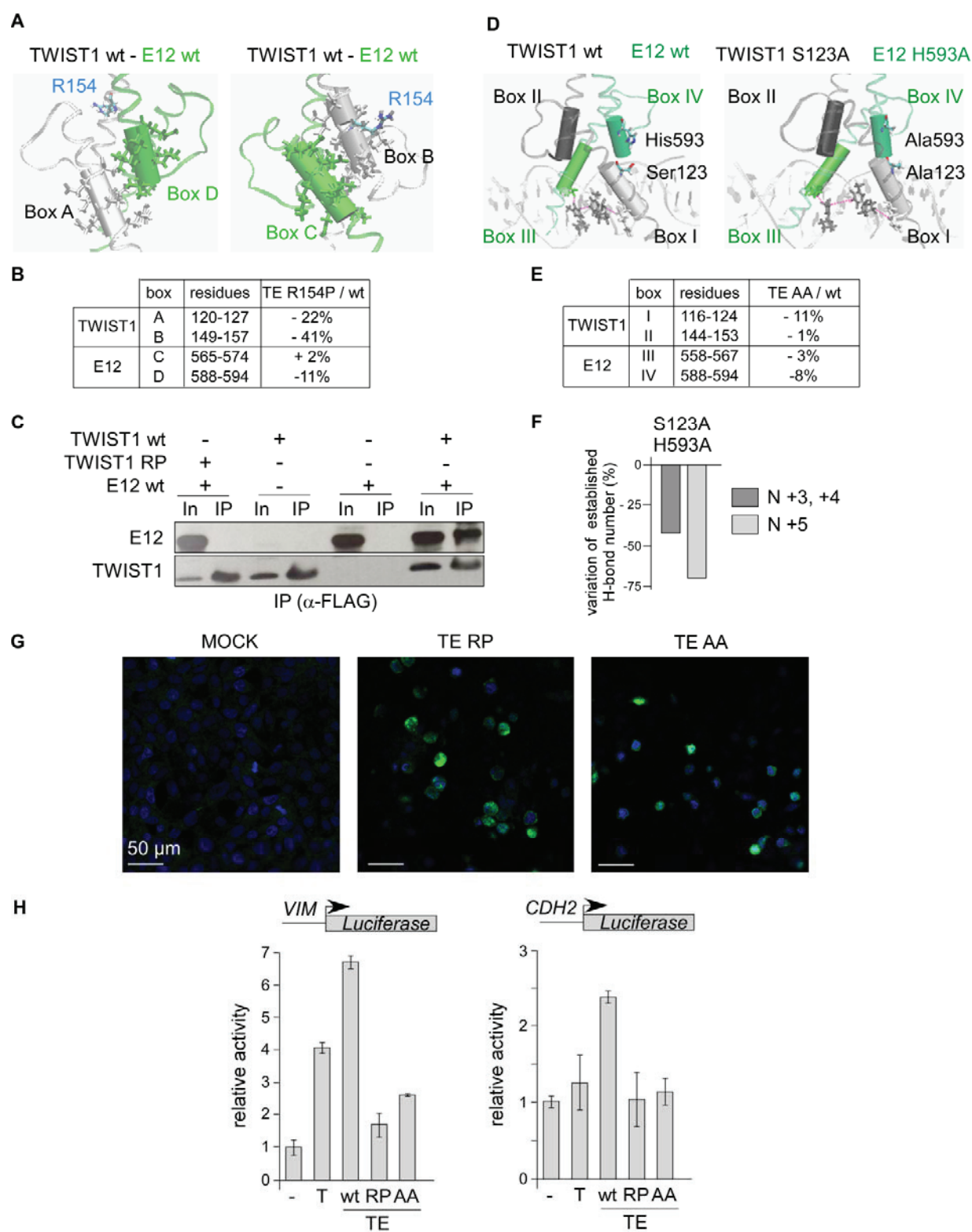
Figure 1

Taking advantage of the fact that the shRNA *TWIST1B* targets the *TWIST1* 3'UTR absent in the tethered dimer constructs, MDA-MB-436 cancer cells were sequentially infected with forced dimer expressing retroviral constructs and depleted in endogenous TWIST1 protein. As shown in Fig. 1, the wild-type heterodimer (TE), as well as the ectopically expressed TWIST1 (T) monomer used as internal control, were able to complement the withdrawal of the endogenous TWIST1 protein, maintaining reduced CKI expression and consequently sustaining breast cancer cell proliferation. In comparison, the TWIST1 homodimer (TT) failed to do so, suggesting that in such an assay the heterodimeric complex is the active form of TWIST1. Of note, ectopic expression of the forced dimers gave rise to the detection of lower molecular-weight bands, likely reflecting degradation products (Fig.1E). Similar sub-products were detected with the functional murine (Myc)<sub>6</sub>-TWIST1-TWIST1 and (Myc)<sub>6</sub>-TWIST1-E12 forced dimers (24) (Supplementary Fig. 2D). In support of our conclusion, the TE heterodimer was similarly shown to specifically complement the endogenous TWIST1 function in sustaining Hs578T and BT-474 cell proliferation (Supplementary Fig. 3). Given that the TT dimer display no apparent activity in the aforementioned assay, its functionally was further controlled by assessing its ability to transactivate a set of TWIST1 target genes identified in established genetic signatures (6, 29). As shown in Supplementary Figure 4, the homodimer was found as active as the TWIST1 monomer and its transcriptional potential to be alleviated when the activity of the forced dimer was impaired through insertion of a single substitution (K145E) reported to fully attenuate its DNA binding potential (30).



### **Efficient partner dimerization and DNA binding activity are requested for TE functions**

To ascertain the need for a functional TWIST1-E12 heterodimeric complex to sustain cell proliferation, we next inserted punctual mutations into the tethered heterodimer, which either disrupted the interaction between the partners or altered the binding capacity of the complex to DNA with the aim to confirm that such mutants failed to complement TWIST1 function. The substitution of the TWIST1 residue Arg154 into Pro (mutation R154P) was suggested to disrupt the TWIST1-E2A protein interaction (26). Taking benefit of our recently established *in silico* model of the bHLH domains of the heterodimeric complex bound to its DNA target sequence (31), this substitution was confirmed to induce a significant distortion of the structure, to alter the H-bond integrity within  $\alpha$ -helices present in the HLH dimerization domains and to destabilize the protein complex (Fig. 2A-B and Supplementary Fig. 5-7, detailed information regarding the structural functional analysis is provided in the supplementary information section). Consequently, the residue substitution abrogates the ability of TWIST1 to interact with E12, as assessed in a co-immunoprecipitation assay (Fig. 2C). We additionally focused on the TWIST1 Ser123 residue, as its phosphorylation was reported to alter the balance between homo- and heterodimer formation (32) and as its polymorphic substitution into Trp associates with a Saethre-Chotzen phenotype, a human syndrome recurrently associated with a loss of TWIST1 function (33). The Ser123 was found to be located within the vicinity of the His593 residue of E12 and its phosphorylation was shown to reduce the distance between the  $\alpha$ -helices and the DNA molecule, likely strengthening the binding affinity of the heterodimeric complex (C. B. and L. P., unpublished data). We thus assessed the consequences of the substitution of these two residues into Ala (mutations S123A in TWIST1 and H593A in E12) and actually demonstrated that the double mutant impacts on structural determinants essential for partner dimerization and



protein-DNA complex stability (Fig. 2D-F, Supplementary Fig. 8 and 9). Collectively, this structural and functional analysis allowed us to design mutations impacting on either the stability of the heterodimeric complex or on its DNA binding potential. Mutations were confirmed to impact on neither tethered dimer production (Fig. 1E) nor on its nuclear localization (Fig. 2G). As expected, both R154P (RP) and S123A- H593A (AA) mutations led to the inactivation of the tethered TE dimer, as judged by their inability to activate the two TWIST1-target genes *VIM* and *CDH2*, as assessed in a reporter assay (Fig. 2H). In support of the need for a functional TWIST1 heterodimeric complex to alleviate latent OIS in the breast cancer cell line, both mutants were confirmed not to complement the endogenous TWIST1 function to sustain cell proliferation (Fig. 1C).

### **The TWIST1 dimers unequally alleviate OIS in human mammary epithelial cells.**

In light of the differential activity observed for the two TWIST1 dimers in preventing OIS in breast cancer cells, we presumed that the TE complex should be the only TWIST1 complex capable of overriding RAS-induced senescence. To test this assumption, we sequentially enforced the production of an inducible HRAS<sup>G12V</sup> (ER-HRAS<sup>G12V</sup>) protein and TWIST1 (monomer T, tethered TT or TE dimer) protein in immortalized and non-transformed human mammary epithelial cells (HMEC-hTERT) and assessed the capability of each of these TWIST1 proteins to override senescence induction due to activation of the ER-HRAS<sup>G12V</sup> fusion protein by hydroxyl-tamoxifen (+ 4-OHT) (Fig. 3A). As expected, the ER-HRAS<sup>G12V</sup> protein activation triggered a senescence program, as judged by the detection of a SA- $\beta$ -galactosidase activity (Fig. 3B), when cells were cultured in a medium supplemented with 2 mM Glucose. While the *CDKN2A-ARF* locus is methylated in HMEC-hTERT cells (34-36), commitment into senescence was associated

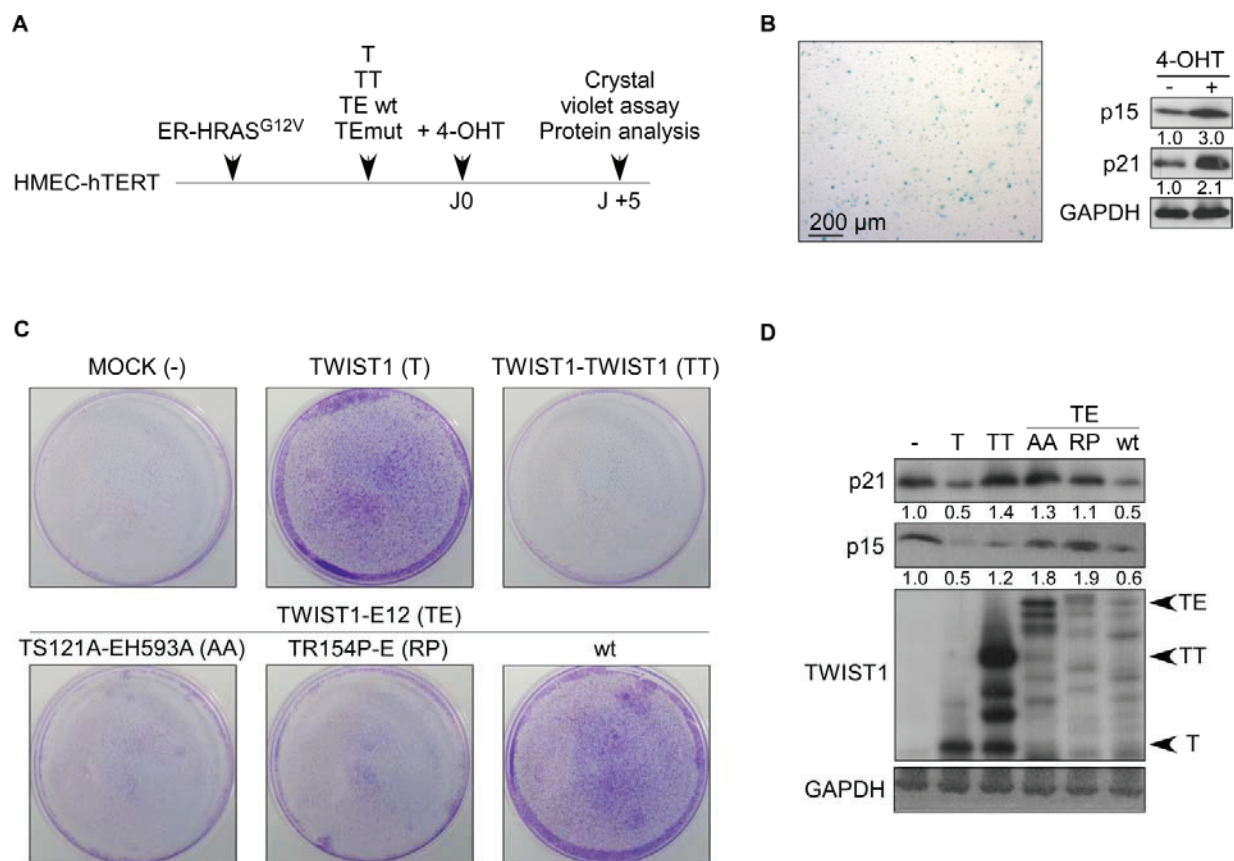


Figure 3

with an accumulation of p15<sup>INK4B</sup> and p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (Fig. 3B). In support of our conclusion, the active heterodimeric TE complex was found to be the unique TWIST1 complex to prevent CKI accumulation and to sustain cell proliferation (Fig. 3C-D).

**The TWIST1 heterodimer triggers partial EMT and facilitate the neoplastic transformation of human mammary epithelial cell transformation by mitogenic oncoproteins.**

We previously demonstrated that partial commitment of mammary epithelial cells into an EMT program increases their plasticity, facilitating either the acquisition of mesenchymal features when exposed to an EMT-permissive microenvironment or to neoplastic transformation by oncoproteins (6). We then assessed the consequences of the enforced expression of TWIST1 dimers on mammary epithelial cell morphology. As previously observed with the TWIST1 monomer (15), production of the wild-type TE complex in HMEC-hTERT cells, unlike the homodimeric TT complex and inactive TE variants, associated with a slight increase in fibronectin and vimentin proteins while the E-cadherin level remained constant (Fig. 4A). None of the TWIST1 complexes induced drastic changes, with cells maintaining their cobble-stone phenotype (Fig. 4B). Nonetheless, TE-producing cells displayed a significant increased responsiveness to TGF $\beta$ , an EMT-promoting cytokine. After one week of treatment, cells displayed a spindle morphology, expressed mesenchymal markers and only residual E-cadherin (Fig. 4A-B). The TE complex, unlike its TT counterpart, is thus able to trigger partial commitment of mammary epithelial cells into EMT. This property is expected to facilitate the neoplastic transformation of cells by mitogenic oncoprotein such as RAS. To evaluate this assumption, cells were sequentially infected with *TWIST1* and constitutive *HRASG12V* retroviral expression constructs and cultured in a medium supplemented with 25 mM Glucose, conditions

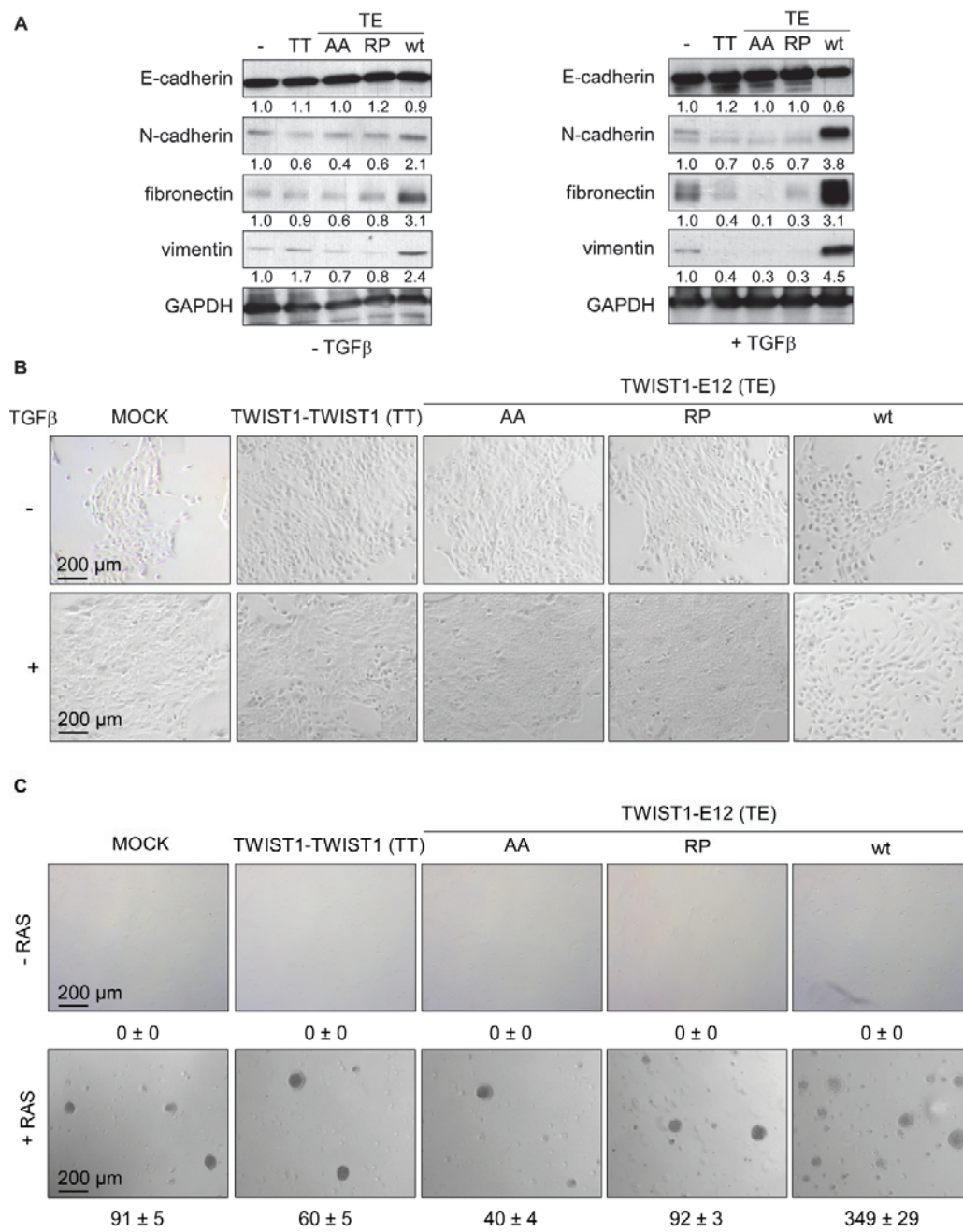


Figure 4

avoiding OIS. While sole expression of the TWIST1 tethered dimer fails to transform cells, concomitant production of HRAS<sup>G12V</sup> and the active heterodimeric complex successfully afford cells a transformation potential, as assessed in a colony formation assay (Fig. 4C). In line with our expectations, neither the homodimeric TT complex nor the inactive forms of the TE complex were found to be functional in this assay. The observed differential was confirmed not to rely on an unequal *RAS* protein level (Supplementary Fig. 10). Collectively, these observations demonstrated that the heterodimeric TWIST1-E12 complex was also the active form of TWIST1 in regards to EMT induction in mammary epithelial cells.

**Forced expression of the TWIST1-E12 heterodimeric complex in mammary epithelial cells specifically confers mice an exacerbated susceptibility to spontaneously develop breast carcinoma.**

To validate the differential oncogenic potential between the two TWIST1 complexes *in vivo*, we next assessed whether their aberrant production in mammary epithelial cells also unequally promotes tumor development. To evaluate this assumption, *TT* or *TE* expression was enforced in luminal committed cells through generation of WAP: *Twist1-Twist1* and WAP:*Twist1-E12* mice by crossing CAG-LSL-*Twist* and WAP-*Cre* mouse strains (25, 37). Full activation of the Whey Acidic Protein promoter was assured by two consecutive lactations. After a latency period of more than 18 months, reflecting the need for additional alterations to fully transform cells, TE-expressing mice were found to develop breast carcinomas with a significantly higher frequency (39.2%, n=28) than TT-expressing mice (14.2%, n=14) and control littermates (14.2%, n=14) (Fig. 5 and Table 1). Tumor phenotypes were found to be heterogeneous, including glandular and differentiated, malpighian, or metaplastic carcinomas (Supplementary Table 1). No secondary



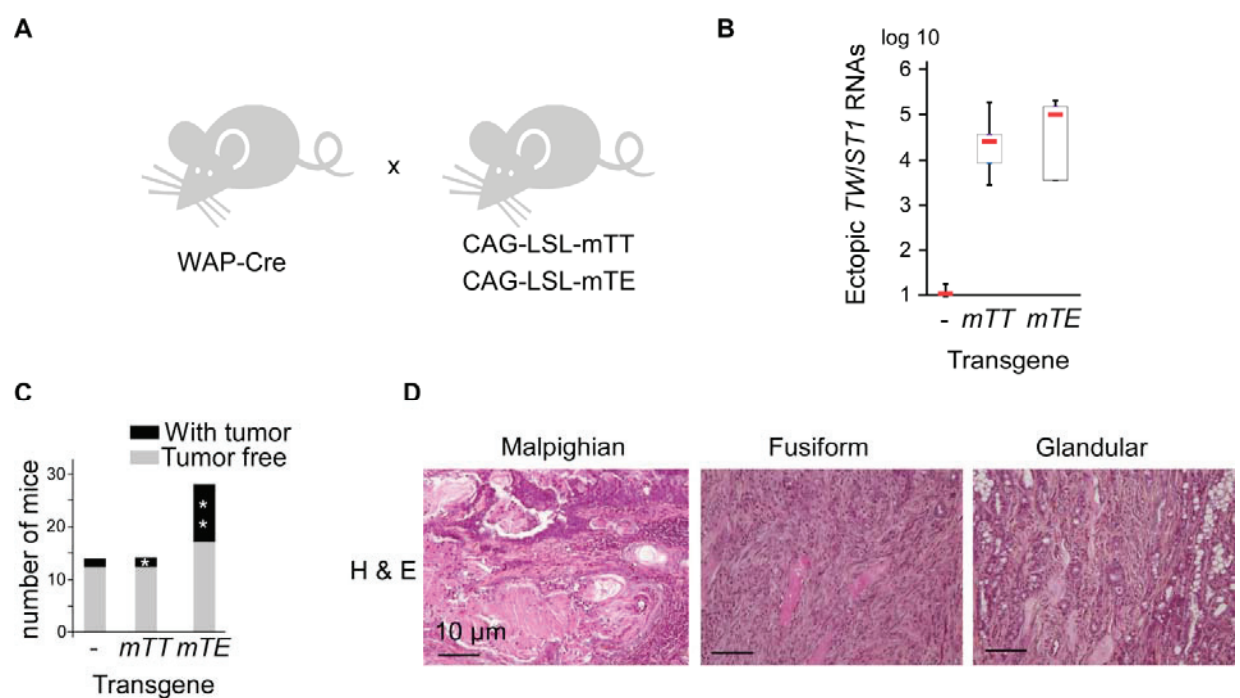


Figure 5

tumor site was detected. This observation highlighted the *in vivo* oncogenic properties of TWIST1-E12 heterodimer and strengthened the differential activity observed between the TT and TE complexes in triggering the neoplastic transformation of mammary epithelial cells.

**The heterodimeric TWIST1-E12 complex is detected in human breast premalignant lesions.**

If the assumption that the heterodimeric TWIST1 complex plays a role in malignant transformation and breast cancer cell survival and proliferation is correct, we would expect that this complex would already be detectable in *in situ* ductal carcinoma (DCIS), long before the metastatic cascade initiates. We thus assessed TE complex formation through a proximity ligation assay (PLA), selecting cases previously defined as TWIST1-positive or -negative by immunohistochemistry (6). Experimental conditions were established in mammary carcinoma cell lines and the specificity of the signal was confirmed by turning-down the expression of either the endogenous *TWIST1* or *TCF3* (the E12/E47 proteins-encoding gene) through RNA interference (Supplementary Fig. S11). As shown in Fig. 6, the TE complex was invariably detected in all TWIST1-positive DCIS. As a control, no signal was detected in either TWIST1-negative DCIS or in normal mammary gland. The detection of the TE complex in premalignant lesions is thus compatible with the protein having a role in primary tumor formation.

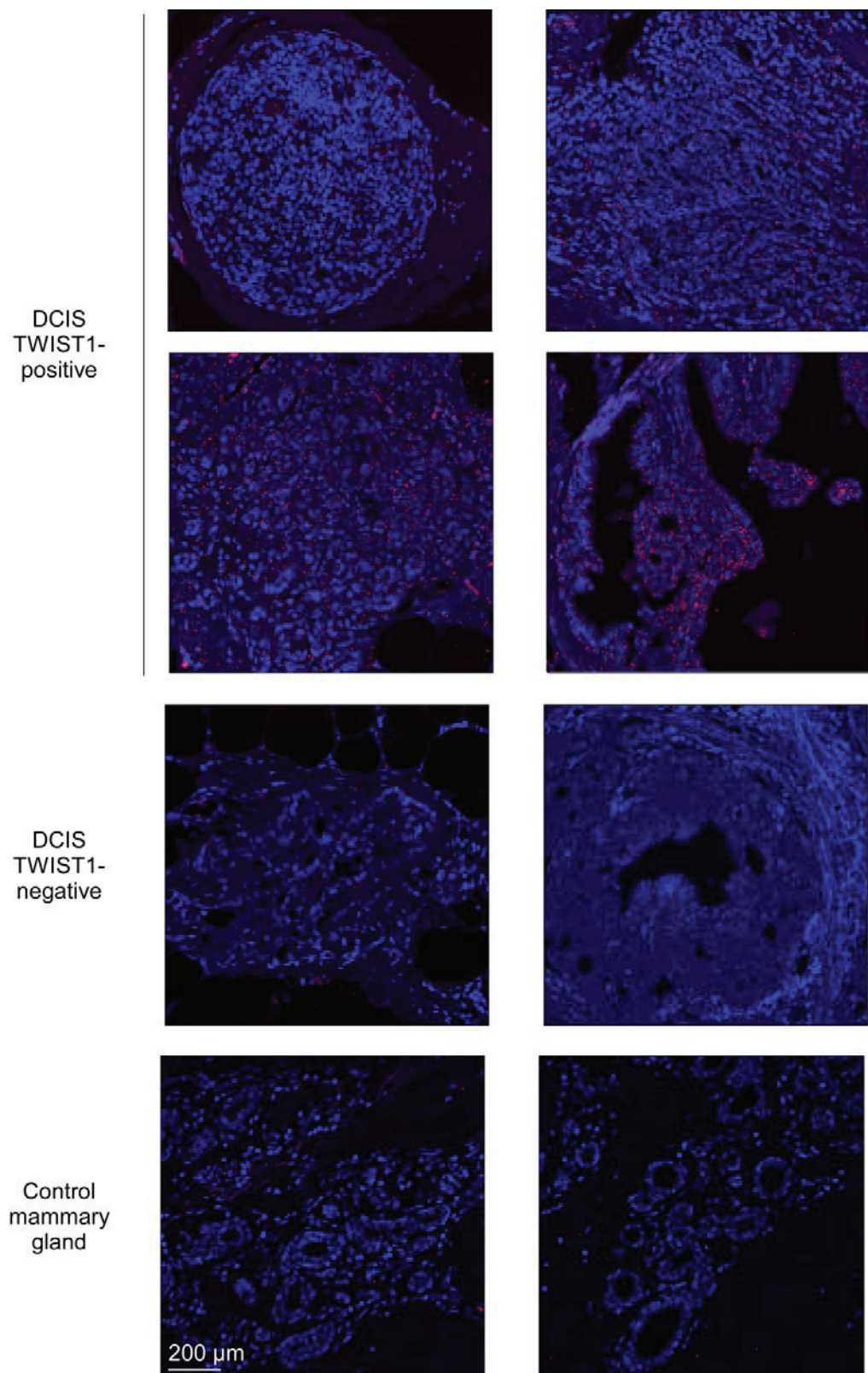


Figure 6

## Discussion

The TWIST1 transcription factor displays oncogenic and pro-metastatic properties mainly due to its ability to alleviate fail-safe programs and to trigger EMT (38, 39). In the present report, we assess the contribution of both TWIST1 complexes in relation to the oncogenic potential of TWIST1. To this end, tethered dimers were generated, a strategy previously employed to delineate the respective functions of the TWIST1 homo- and heterodimers during mouse embryonic development (24, 25, 28). In light of the absence of the *HAND1/2* transcripts in the examined TWIST1-dependent breast cancer cell lines (Supplementary Fig. S2A), the HAND-TWIST1 heterodimer was excluded from our study. As E proteins are functionally redundant, binding of TWIST1 to E proteins was represented by the TWIST1-E12 complex. Strikingly, we demonstrated that the tethered TE dimer, unlike its homodimeric counterpart, is able to complement TWIST1 function in sustaining breast cancer cell proliferation, overriding HRAS<sup>G12V</sup>-induced senescence in immortalized mammary epithelial cells, triggering partial EMT and cooperating with the mitogenic protein in promoting their neoplastic transformation. As breast cancer cells of the claudin-low subtypes display mutant *TP53* and *RBI* status, oncogene-induced senescence likely results from CKI accumulation and relies on their p53- and RB-independent functions. This observation strengthens the conclusion that TWIST1 facilitates the escape from senescence through multiple mechanisms in different cellular setting (18). In support of a role of TE in the oncogenic potential of TWIST1, the TE heterodimer was found to be expressed in breast premalignant lesions, at a stage preceding the metastatic cascade initiation. Furthermore, aberrant expression of TE in luminal committed mammary epithelial cells significantly increases the risk of mice to develop breast tumors with time. The long latency and the heterogeneity within the TWIST1-driven breast carcinomas likely reflect the need of variable secondary events to fully transform cells. We are currently addressing the consequences of the

activation of these embryonic factors on the course of events leading to neoplastic transformation. Noticeably, we previously demonstrated that TWIST1 and RAS actively cooperate in promoting breast carcinoma in mice, leading to tumor development in less than 3 months (6). We now unambiguously show that the TWIST1 heterodimer displays an intrinsic oncogenic potential *in vivo*.

Interestingly, by performing complementation assays, Philogene and colleagues demonstrated the predominant function of the HLH8-HLH8 (the *C. elegans* TWIST ortholog) homodimeric complex in enteric development (40). Along this line, by using a similar tethered dimer strategy, James Cross's laboratory recently highlighted the dominant role of the HAND1 homodimer during mouse development, likely restricting the heterodimer function to a role in counterbalancing the activity of the HAND1 homodimer *in vivo* (41). The relative contribution of bHLH complexes during embryonic development and tumorigenesis may thus be inverted.

By mutating key residues, based on literature and our recently established *in silico* structural model (31), we confirmed that the functionality of the TWIST heterodimer requires efficient interaction between both partners and correct folding of the complex to stably bind to its target DNA sequence. Interestingly, the Ser123 in TWIST1 was previously shown to be phosphorylated by PKA and to alter the TWIST1 homo- and heterodimer equilibrium (32). Our structural analysis emphasizes the important role of the Ser123 residue. In line with this hypothesis, substitution of the Ser123 to Trp associates with a typical Saethre-Chotzen syndrome (SCS) phenotype (33): a syndrome wherein TWIST1 alterations invariably lead to a loss of function. Furthermore, the R154P mutation impacts on the position of TWIST1 Lys145 and E12 Lys588 (Supplementary Fig. 7B), residues essential for DNA binding (30, 31). Strikingly, the substitutions of the Arg154 to Gly and of the Lys145 residue to Asp or Glu were also found in SCS patients (30). In conclusion, this structural analysis led us to provide a rational link between

numerous TWIST1 loss-of-function mutations found in SCS patients, strengthening the relevance of our structural model for further investigations.

## **Acknowledgments**

We are grateful to the Biological Resource Center of the Centre Léon Bérard for providing the cohort of human breast samples and to Dr Isabelle Treilleux and Sophie Léon for selecting and sorting the cases. We are thankful to Pr Cornelis Murre (University of California, San-Diego, USA) and Pr Masataka Nakamura (Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan) for providing the human E12 expression construct, Pr William C. Hahn for providing the EcoR retroviral expressing construct (Harvard University, USA), Dr Patrice Lassus (IGMM, Montpellier, France) for the shRNA *TWIST1* directed against its 3'UTR (shRNA *TWIST1* B), Pr Jesus Gil (MRC, London, UK) for the ER-RAS construct, Dr Ivan Mikaelian (CRCL, Lyon, France) for the *VIMI*-luciferase reporter, Dr Pierre J. Marie (INSERM U606, Paris, France) for the *CDH2*-luciferase reporter and Dr Didier Negre (INSERMU111/CIRI, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France) for providing the pCMVΔR8.91 and pHCMVG-VSVG vectors. Authors are thankful to the AniCan and ALECS animal facilities as well as to Nicolas Gadot (Anipath facility) for mouse tissue section embedding and H & E staining. Authors are grateful to Dr Baptiste Gras and Abdel-Adhime Benhassine for their technical help in generating tethered dimers and their contribution in establishing Co-IP experimental conditions respectively, as well as to Dr Ulrich Valcourt (CRCL, Lyon, France) and Dr Patrice Lassus (IGMM, Montpellier, France) for their scientific inputs. We would like to thank Dr Louise Hill for critical reading of the manuscript.

## **Funding**

Our team is labeled by the Ligue Nationale contre le Cancer. This work was additionally supported by institutional grants from the LabEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-61) and from the LyRIC (Lyon Recherche Intégrée en Cancérologie, Institut National contre le Cancer, INCa\_4664). LJ, GR and CB were recipients of fellowships from the Ligue Nationale contre le Cancer and the Foundation ARC pour la Recherche sur le Cancer. APi is financed through the LyRIC.

## **Author contributions**

Conception and design: LP, AT, SA.

Development of methodology: LJ, CB, GR, LP, RT, JC.

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc...): DBS

Analysis and interpretation of data: LJ, CB, LP, AP, AT, SA.

Writing: SA.

Study supervision: LP, AT, SA.

Histopathology and immunohistology: M. D-S., A. Pi.



## Figure Legends

### **Figure 1: Fully active TWIST1-E12 heterodimeric complex is required to complement the endogenous TWIST1 function in sustaining MDA-MB-436 breast cancer cell proliferation.**

**A**, MDA-MB-436 breast cancers were depleted in TWIST1 through RNA interference (shRNA *TWIST1* A or B as indicated on top). Two days post-infection, cells were seeded at low density and stained 3 days later with crystal violet (top panels) or assessed for their SA- $\beta$ -galactosidase activity. **B**, Analysis of Ser10-histone H3 (H3-S10), p15<sup>INK4B</sup> (p15), p16<sup>INK4A</sup> (p16), p21<sup>CIP1</sup> (p21), and TWIST1 by Western-blotting (relative signal quantification in respect to shRNA *Control* infected cells is indicated). b.d.l. means below detection limit. **C**, MDA-MB436 cells were sequentially infected with T, TT or TE (either wild type (wt) or TS121A-EH593A (AA) or R154P (RP) mutant constructs) retroviral expression vectors and depleted in endogenous TWIST1 through RNA interference (shRNA *TWIST1B*). Notice that the shRNA targets 3' untranslated sequence that is absent from the tethered dimers and thus specifically turns-down the endogenous *TWIST1* expression. Cells were seeded at low density 48h post-infection and stained with crystal violet 3 days later. **D**, Expression analysis of the endogenous *TWIST1* by Q-RT-PCR. Levels were expressed relative to the housekeeping *HPRT1* gene transcript, and were normalized with respect to uninfected MDA-MB-436 cells  $\pm$  SD of triplicates. **E**, Analysis of p21<sup>CIP1</sup> (p21), p15<sup>INK4B</sup> (p15) and TWIST proteins by Western-blot (relative signal quantification in respect to MOCK cells is indicated).

**Figure 2. Design of mutations disrupting the dimer TWIST1-E12 or its DNA binding potential.**

**A-C**, The R154P mutation impairs the TWIST1-E12 dimerization. **A**, Structure of the heterodimeric TWIST1-E12. Structures are represented as ribbons respectively in grey (for TWIST1), green (for E12). Position of the R154 residue (in blue) and of the series of residues determinant for the structural conformation of the heterodimer (Boxes A to D) are shown. **B**, Evaluation of the impact of the R154P mutation on the stability of H-bonds established between residues within individual boxes. **C**, The R154P mutation abrogates the ability of TWIST1 to interact with E12, as assessed by a Co-IP assay. Wild type (wt) or mutated version (R154P, RP) of TWIST1 and E12 were transiently produced in HEK293T cells as indicated on top. TWIST1 protein was immuno-precipitated with a monoclonal  $\alpha$ -FLAG antibody and the presence of E12 protein in the immunoprecipitates (IP) was assessed by Western-blot. In: input 10%. **D-F**, The S123A and H593A substitutions in TWIST1 and E12 respectively disrupt the binding of the heterodimeric complex to its target DNA sequence. **D**, Visualization of the position of structural determinants (Boxes I to IV) in the wild type or double mutant (S123AH593A) heterodimeric complex structures essential for its DNA binding properties. Notice that Box I of TWIST1 and Box III of E12 are directly in contact with DNA. Positions of Ser123 and His593 residues in the wild type (wt) heterodimer and the Ala123 and Ala593 residues in its mutated variant are shown in CPK representation. **E**, Evaluation of the impact of the double substitution on the stability of H-bonds established between protein-protein residues and between protein residues and DNA, in each individual box. **F**, The S123A and H593A mutations significantly reduce the hydrogen bond stability established between residues within the TWIST1 Box I and E12 Box III with the nucleotides +3, +4, and +5 of the E-box, respectively. **G**, Expression and sub-localization analysis of the mutant heterodimers. 293T cells were transiently transfected with TWIST1

expression constructs as depicted on top and protein analyzed by immunofluorescence 24h post-transfection, using a monoclonal anti-FLAG antibody. **H**, Both single R154P (RP) and double S123A H593A (AA) substitutions alleviate the ability of the heterodimer complex to activate the *Vimentin* (*VIM*) and N-Cadherin (*CDH2*) promoters, as assessed in a luciferase reporter assay.

**Figure 3. Homo- and heterodimeric TWIST1 complexes unequally avoid RAS-induced senescence in mammary epithelial cells.**

**A**, HMEC-hTERT cells were sequentially infected with the inducible ER-H-RAS<sup>G12V</sup> fusion protein and with either monomeric TWIST1, homodimeric TWIST1 tethered dimer, or wild-type (wt) or mutant (mut) TWIST1-E12 heterodimeric tethered dimer as depicted on top. **B**, The activation of the ER-HRAS<sup>G12V</sup> protein with 4-OHT associated with senescence induction as assessed by a SA- $\beta$ -galactosidase assay and p15<sup>INK4B</sup> (p15) and p21<sup>CIP1</sup> accumulation, as assessed by Western-blot. **C-D**, Five days post-activation of ER-HRAS<sup>G12V</sup> with 4-OHT, cell proliferation was assessed through a crystal violet staining (**C**) and p21<sup>CIP1</sup>, p15<sup>INK4B</sup> and TWIST1 proteins were analyzed by Western-blot (**D**).

**Figure 4. Homo- and heterodimeric TWIST1 complexes unequally trigger EMT and cooperate with H-RAS<sup>G12V</sup> in promoting mammary epithelial cells.**

**A-B**, The heterodimeric complex triggers partial commitment to EMT. Forced expression of the wild type (wt) heterodimeric TWIST1 complex (TE) in human mammary epithelial cells, unlike the homodimeric complex (TT) and the heterodimeric inactive variants (RP and AA), induces partial commitment to EMT as judged by the analysis of epithelial and mesenchymal markers by Western-blot (**A**, left panel) and the maintenance of an epithelial cobble-stone morphology (**B**, upper panels). Forced expression of the heterodimeric complex specifically sensitizes cells to

EMT permissive conditions (TGF $\beta$ ), as assessed by the analysis of epithelial and mesenchymal marker by Western-blot (**A**, right panels) and the acquisition of a fibroblastic cellular morphology (**B**, lower panels). **C**, HMEC-hTERT cells were sequentially infected with *TWIST1* (TT, wt or mut TE as indicated) and *HRASG12V* (RAS) retroviral expression vectors. After one week of selection, the transformation potentials of the established cell lines were assessed in a soft-agar colony formation assay. Numbers of colonies are indicated  $\pm$ SD of triplicates.

**Figure 5: Forced expression of homodimeric or heterodimeric TWIST1 complexes in luminal committed mammary epithelial cells confer mice with a differential susceptibility to spontaneously develop breast carcinoma.**

**A**, *Twist1* expression in luminal committed mammary epithelial cells was achieved by crossing CAG-LSL-(Myc)<sub>6</sub>-*Twist-Twist1* or CAG-(Myc)<sub>6</sub>-LSL-*Twist1-E12* and WAP-Cre mice. **B**, Plot boxes indicating the expression of ectopic *TWIST1* transcripts, as assessed by Q-RT-PCR. Levels were expressed relative to the housekeeping *HPRT1* gene transcript, and were normalized with respect to wild-type mice-derived breast carcinoma developed. **C**, Histogram indicating the number of mice spontaneously developing breast carcinoma during their lifespan. Stars mark mice with two breast tumors. **D**, Representative hematoxylin and eosin (H&E) of the various tumor types observed.

**Figure 6: The heterodimeric complex is detectable in breast premalignant lesions, as assessed in a Proximity Ligation Assay.**

Assessment of the TWIST1-E12 heterodimeric complex in a proximity ligation assay (PLA) in TWIST1-positive and TWIST1-negative ductal carcinoma *in situ* (DCIS). Healthy mammary gland was used as a control. Each single dot corresponds to the detection of a TE complex.

## Materials and methods

### DNA constructs

The EcoR pBabe Zeo, ER-HRAS<sup>G12V</sup> pLNCX2-Neo retroviral construct, the *VIMI*-luciferase and the 3.7 Kb *CDH2* reporter have been previously described (42-45).

The tethered dimers were generated by PCR using FLAG-human TWIST1 (15) and E12 expression constructs (46) as templates. A silent mutation was inserted into E12 to disrupt an internal XhoI site using the 5'-ACGTCACAGTGGCCCCGGGCAGGAGCCC-3' and 5'-GGGCTCCTGCCCCGGGGCCACTGTGACGT-3' primer pair and the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The tethered dimers were generated by sequential sub-clonings of PCR products synthesized with the Q5 high fidelity DNA polymerase (NEB) and primers from Eurogentec.

Briefly, the *FLAG-Twist1* DNA fragment was amplified with the 5'-CGCGGATCCCGCAAATGGGCGACTATAAGGACG-3' and 5'-CCAAGCTTGTGGGACGCGGACATGGACCAGG-3' primer pair, digested with BamH1/HindIII and sub-cloned in the pBluescript II KS vector. The linker was generated by annealing the two oligonucleotides 5'-AGCTTGGCGGAGGATCGAGCGGTGGGAGCGGCGGAGGGTCCGGCGGAGGATCGAGCGGTGGGAGCGGCGGAGGGTCCGGCC-3' and 5'-TCGAGGCCGGACCCTCCGCCGCTCCCACCGCTCGATCCTCCGCCGGACCCTCCGCCGCTCCCACCGCTCGATCCTCCGCCA-3' and by sub-cloning the dsDNA upstream of TWIST1 within the HindIII/XhoI sites. The sequences of the second partner, either TWIST1 or E12, were amplified by PCR using the 5'-CCAAGCTTGTGGGACGCGGACATGGACCAGG-3' and 5'-ACGCGTCGACGTCTAGTGGGACGCGGACATGG-3', and 5'-CCGCTCGAGAACCAGCCGCAGAGGATG-3' and 5'-

ACGCGTCGACGTCACATGTGCCCCGGCGGGGTTG-3' primer pairs respectively. DNAs were digested with the enzymes XhoI/SalI and sub-cloned upstream of the TWIST1-linker sequence. The full size FLAG-TT or FLAG-TE BamHI-SalI insert was next inserted into the pBabe retroviral construct (Addgene). Mutant TWIST1 and E12 DNAs were synthesized by Genscript and inserted in TT and TE constructs.

The shRNA *Twist1* A pLKO.1 (5'-GCTGAGCAAGATTCAGACC-3') lentiviral construct has been previously described (15). The shRNA *Twist1* B pSIREN (5'-CTCTGGAGCTGGATAACTAAA-3') retroviral construct was kindly provided by Patrice Lassus (IGMM, Montpellier). The shRNA *TCF3* pLKO.1 (5'-ATGAGAGTGCTGGACTCCTAC-3') was supplied by Sigma.

## Mouse strains

Animal maintenance and experiments were performed in a specific pathogen free animal facility "Anican" in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Committee (CECAAP). The CAG-LSL-(*Myc*)-*Twist1-Twist1* or CAG-LSL-(*Myc*)-*Twist1-E12* (FVB/NJ genetic background) (25) were crossed with the WAP-Cre (Whey Acidic Protein promoter, Wagner et al., 1997) mouse strain (B6.Cg-Tg(Wap-Cre)11738 Mam, obtained from the mouse models of Human Cancers Consortium and back-crossed to the FVB/NJ genetic background). Cohorts of multiparous female WAP-Cre; (*Myc*)-*Twist1-Twist1* and WAP-Cre; (*Myc*)-*Twist1-E12* mice (with two rounds of lactation) were generated. Genotyping was performed on genomic DNA from tails using the 5'-AATGAAATGGAGAGCTTGGGCGAC-3' and 5'-CATCACTCGTTGCATCGACC-3' for the WAP-Cre transgene and 5'-GCAAGCGCGGCAAGAAATCTG-3' and 5'-CCCGTTCAAGTCCTCTTCAGAAATGAC-3' primer pair for the *Twist1* transgene as described

in (25, 37). Mice were monitored twice a week for tumor incidence. End points were based on tumor diameter (up to 1.5 cm) unless natural death. Mice were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation. Tumors were fixed in 10% phosphate-buffered formalin during 24 h, and embedded in paraffin. Mammary gland, lung, liver, kidney and spleen were collected to either check for malignant lesions or to assess potential metastatic dissemination.

### **Cell culture**

HMEC-hTERT cells and derivatives were cultured as described (6). The Hs578T, MDA-MB-436, MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cell lines and HEK293T were provided by the ATCC and cultured according to the manufacturer.

### ***In silico* structural analysis**

To predict the impact of the residue substitutions inserted in the tethered dimers, the *in silico* structural model of the bHLH domains of the TWIST1-E12 dimeric complex bound to its cis-responsive element previously established by homology with the NEUROD1(2q12B)/E47(2q12A) template was used (31). Residue substitutions were inserted in these minimized models and submitted to 10 ns molecular dynamics analysis as described (31). Statistical analysis of established H-bonds was performed by assessing the distances between residues and/or bases during the dynamics simulations (100 conformations per ns), considering that H-bonds are established when the two functional groups are spaced less than 2.1Å. The frequency (%) of H-bond implementation was assessed. The impact of a substitution on the total stability of H-bonds between residues and bases, or with the DNA excluded, was assessed to delineate their impact on the stability of the complex with or without DNA, respectively.



## Protein analysis

Cells extracts were performed in RIPA buffer (100 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH8) supplemented with a complete protease inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma) and clarified by centrifugation. Proteins were analyzed by Western-blot using the monoclonal anti-TWIST1 2C1a (Abcam), anti-p21<sup>CIP1/WAF1</sup> clone SX118 (Dako), anti-E-cadherin clone 36 (Becton Dickinson), anti-vimentin clone V9 (Dako), anti-fibronectin clone 10 (Becton Dickinson), anti-N-cadherin clone 32 (Becton Dickinson), antibodies, the polyclonal anti-E2A N-649 (Santa-Cruz), anti-H-RAS clone 20 (Santa-Cruz), anti-p15<sup>INK4B</sup> clone C20 (Santa-Cruz), anti-p16 clone H156 (Santa-Cruz), p-histone H3 (Ser10)-R (Santa-Cruz) and anti-GAPDH clone Abs16 (Millipore) antibodies and horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako). Antigen-antibody complexes were revealed with the Western-blotting Luminol reagent (Santa Cruz).

## Gene expression analysis

RNA preparation and reverse transcription were performed as described in (47). Real time PCR intron-spanning primers were designed with the primer3 software. The *HPRT1* housekeeping gene was used for normalization. The following combinations of primers were used:

Gene	NCBI RefSeq	Primers
<i>HPRT1</i>	NM_000194	5'-TGACCTTGATTTATTTGCATACG-3' 5'-CGAGCAAGACGTTCACTCCT-3'
<i>TWIST1</i>	NM_000474	5'-GGCTCAGCTACGCCTTCTC-3' 5'-CCTTCTCTGGAACAATGACATCT-3'
<i>HPGD</i>	NM_000860	5'-TCTTTAGCAGGACTCATGCCGTTG-3' 5'-TGGCATTCACTCTCACACCACTGT-3'
<i>HAS2</i>	NM_005328	5'-GCCTTCAGAGCACTGGGACG-3' 5'-TTAAAATCTGGACATCTCCCCCAACACC-3'
<i>HSD11B1</i>	NM_005525	5'-CAATGGAAGCATTGTTGTCG-3'

		5'-GGCAGCAACCATTGGATAAG-3'
<i>PIGR</i>	NM_002644	5'-AGGGCGCTACCTGTGTGGAG-3' 5'-GCGGGGAATCGTGGACTCCT-3'
<i>HAND1</i>	NM_004821	5'-CGCAGAAGGGTTAAACAGGT-3' 5'-CAAGGCTGAAAATGAGACGC-3'
<i>HAND2</i>	NM_021973	5'-AAACAGGGCCGCTAACATTT-3' 5'-AAGTGCACAAAACAAGTGGC-3'

### **Retroviral infections, SA- $\beta$ -galactosidase, growth curves, and soft-agar colony assays**

Enforced expression of RAS and/or TWIST1 proteins was performed through retroviral infections as described (47). Briefly cells were “murinized” by expressing the ecotropic receptor (43, 48) before being infected with retroviral expression constructs. Sequential infections were spaced by a 48 h period of time. Selection was initiated 24 h post-infection or post-second infection with puromycin (0.5  $\mu$ g/ml) or neomycin (100  $\mu$ g/ml).

shRNA *TWIST1* lentiviral particles were generated through co-transfection of 293T cells with pLKO.1, pCMV  $\Delta$ R8.91 (gag-pop-Tat-Rev) (49) and phCMVG-VSVG (env) (50) expression constructs and shRNA *TWIST* retroviral particles through transfection of HEK293GP cells with pSIREN and phCMVG-VSVG (env) expression constructs using the calcium phosphate precipitation technique. *TWIST1* knock-down was achieved through double retroviral (shRNA *TWIST1* B pSIREN) or lentiviral (shRNA *TWIST1* A pLKO.1) infections spaced by a 24 h period of time. More than 90% of cells were confirmed to be infected. Consequences of TWIST depletion on cell survival and proliferation was next assessed in the absence of selection. Growth curves, initiated two days post-activation of ER-RAS<sup>G12V</sup> with 4-OH-Tamoxifen (4-OHT, 625 nM, Sigma Aldrich), or post-depletion of TWIST1 through RNA interference was performed by seeding cells at 20-30% confluency. Activation of ER-RAS<sup>G12V</sup> with 4-OHT was performed in medium supplemented with 1mM D-Glucose. Three days later, cells were washed twice with PBS1X, either fixed in 3% formaldehyde and stained with crystal violet or tested with a SA- $\beta$ -

galactosidase assay as described (51). Transformation assays were performed one week post-infection (*TWIST1* transduction) or post-second infection (*RAS* + *TWIST* transduction) as described (47).

### **Immunofluorescence**

10<sup>4</sup> cells were seeded on a 12-well IBIDI-chamber slide, fixed in 4% formaldehyde (Sigma) for 15 min, washed with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS buffer and permeabilized in 0.1% Triton 100X (Sigma), 1% BSA in PBS buffer at room temperature for 10 min. The cells were then washed 3 times with 1% BSA in PBS buffer and incubated with the anti-TWIST1 2C1a primary antibody (Abcam, diluted 1/100 in 0.5% BSA in PBS buffer) overnight at 4°C. Following extensive washing in 1% BSA in PBS buffer, cells were incubated with FITC-conjugated Alexa goat anti-mouse antibody (Life Technology, 1/600 in 0.5% BSA in PBS buffer) for 30 min at room temperature. Nuclei were stained with Hoechst 5 mg/ml in 0.5% BSA in PBS buffer for 10 min and mounted with Fluoromount-G (SouthernBiotech). Photographs were performed using an immunofluorescence microscope (Leica) and identical exposure times.

### **Immuno-precipitation**

HEK293T cells were transfected with wild type or mutant FLAG-TWIST1 and/or E12 expression constructs by using the calcium-phosphate technique. 36 h post-transfection, cells were lysed in a 50 mM Tris-HCL pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton buffer supplemented with a complete protease inhibitor cocktail (Roche), cleared by centrifugation and incubated with an anti-FLAG M2 resin (Sigma-Aldrich). After intensive washing to eliminate non-specific binding, the resin was resuspended in Laemmli buffer and boiled for 3 min. After elimination of the beads by centrifugation, samples were reduced by adding  $\beta$ -mercaptoethanol and separated on SDS-

PAGE. Proteins were analyzed with the murine monoclonal anti-TWIST1 C2a antibody (Abcam) and the rabbit polyclonal or mouse monoclonal D7/V18 E2A antibody (Santa Cruz Biotechnology).

### **Proximity Ligation Assay**

Human ductal carcinoma in situ (DCIS) samples were obtained through the Biological Resource Center of the Centre Léon Bérard with the agreement of the reviewal board of the Centre Léon Bérard. Samples were used with the patient's written informed consent. The present study was approved by the reviewal board of the Centre Léon Bérard. DCIS samples were selected according to the expression of TWIST1 as reported (6).

After deparaffinization and rehydration, tissue sections were boiled in a 10 mM PH6 citrate buffer for 40 min. After saturating unspecific binding sites for 20 min with a 1% BSA PBS buffer, sections were incubated overnight with the mouse monoclonal anti-Twist Twist2C1a (ABCAM) and the rabbit polyclonal anti-E2A N-649 (Santa Cruz) antibodies in a 0.5% BSA in PBS buffer. Incubation with PLA probes, ligation and amplification steps were performed according to the manufacturer instructions (Duolink® In Situ kit, Sigma). The specificity of the signal was confirmed by using paraffin-embedded MDA-MB-436, Hs578T (TWIST1-positive, E12-positive) and HMEC-hTERT (TWIST1-negative, E12-positive) mammary cells, wherein *TWIST1* or *TCF3* were specifically knockdown through RNA interference.

## References

- (1) Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14:818-29.
- (2) Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-90.
- (3) De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013;13:97-110.
- (4) Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 2012;22:725-36.
- (5) Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* 2012;22:709-24.
- (6) Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, et al. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 2012;8:e1002723.
- (7) Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 2009;15:489-500.
- (8) Dong C, Yuan T, Wu Y, Wang Y, Fan TW, Miriyala S, et al. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 2013;23:316-31.
- (9) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.
- (10) Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3:e2888.
- (11) Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 2013;24:466-80.
- (12) Alba-Castellon L, Batlle R, Franci C, Fernandez-Acenero MJ, Mazzolini R, Pena R, et al. Snail1 expression is required for sarcomagenesis. *Neoplasia* 2014;16:413-21.
- (13) Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:2207-17.

- (14) Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004;6:625-30.
- (15) Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008;14:79-89.
- (16) Tran PT, Shroff EH, Burns TF, Thiyagarajan S, Das ST, Zabuawala T, et al. Twist1 suppresses senescence programs and thereby accelerates and maintains mutant Kras-induced lung tumorigenesis. *PLoS Genet* 2012;8:e1002650.
- (17) Piccinin S, Tonin E, Sessa S, Demontis S, Rossi S, Pecciarini L, et al. A "twist box" code of p53 inactivation: twist box: p53 interaction promotes p53 degradation. *Cancer Cell* 2012;22:404-15.
- (18) Burns TF, Dobromilskaya I, Murphy SC, Gajula RP, Thiyagarajan S, Chatley SN, et al. Inhibition of TWIST1 leads to activation of oncogene-induced senescence in oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res* 2013;11:329-38.
- (19) Lee SH, Lee SJ, Jung YS, Xu Y, Kang HS, Ha NC, et al. Blocking of p53-Snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. *Neoplasia* 2009;11:22-31, 6p.
- (20) Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS, Michaylira CZ, Grugan KD, Stairs DB, et al. Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res* 2010;70:4174-84.
- (21) Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2011;11:503-11.
- (22) Acosta JC, Gil J. Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 2012;22:211-9.
- (23) Firulli BA, Redick BA, Conway SJ, Firulli AB. Mutations within helix I of Twist1 result in distinct limb defects and variation of DNA binding affinities. *J Biol Chem* 2007;282:27536-46.
- (24) Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Muentener C, Mercado MA, Spicer DB. Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev Dyn* 2006;235:1345-57.
- (25) Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Mercado MA, Dowell K, Yang X, et al. Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Dev Biol* 2008;318:323-34.
- (26) Spicer DB, Rhee J, Cheung WL, Lassar AB. Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 1996;272:1476-80.
- (27) Firulli BA, Howard MJ, McDaid JR, McIlreavey L, Dionne KM, Centonze VE, et al. PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol Cell* 2003;12:1225-37.

- (28) Castanon I, Von SS, Kass J, Baylies MK. Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development. *Development* 2001;128:3145-59.
- (29) Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15449-54.
- (30) El Ghouzzi, V, Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Lajeunie E, Renier D, Munnich A, et al. Mutations in the basic domain and the loop-helix II junction of TWIST abolish DNA binding in Saethre-Chotzen syndrome. *FEBS Lett* 2001;492:112-8.
- (31) Bouard C, Terreux R, Hope J, Chemelle JA, Puisieux A, Ansieau S, et al. Interhelical loops within the bHLH domain are determinant in maintaining TWIST1-DNA complexes. *J Biomol Struct Dyn* 2014;32:226-41.
- (32) Firulli BA, Krawchuk D, Centonze VE, Vargesson N, Virshup DM, Conway SJ, et al. Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat Genet* 2005;37:373-81.
- (33) Kress W, Schropp C, Lieb G, Petersen B, Busse-Ratzka M, Kunz J, et al. Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006;14:39-48.
- (34) Huschtscha LI, Noble JR, Neumann AA, Moy EL, Barry P, Melki JR, et al. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1998;58:3508-12.
- (35) Brenner AJ, Stampfer MR, Aldaz CM. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 1998;17:199-205.
- (36) Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998;396:84-8.
- (37) Wagner KU, Wall RJ, St-Onge L, Gruss P, Wynshaw-Boris A, Garrett L, et al. Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4323-30.
- (38) Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
- (39) Ansieau S, Morel AP, Hinkal G, Bastid J, Puisieux A. TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene* 2010;29:3173-84.
- (40) Philogene MC, Small SG, Wang P, Corsi AK. Distinct *Caenorhabditis elegans* HLH-8/twist-containing dimers function in the mesoderm. *Dev Dyn* 2012;241:481-92.



- (41) Hu D, Scott IC, Snider F, Geary-Joo C, Zhao X, Simmons DG, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor Hand1 regulates mouse development as a homodimer. *Dev Biol* 2013;382:470-81.
- (42) Le MS, Fromigue O, Marie PJ. Sp1/Sp3 and the myeloid zinc finger gene MZF1 regulate the human N-cadherin promoter in osteoblasts. *Exp Cell Res* 2005;302:129-42.
- (43) Boehm JS, Hession MT, Bulmer SE, Hahn WC. Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Mol Cell Biol* 2005;25:6464-74.
- (44) Barradas M, Anderton E, Acosta JC, Li S, Banito A, Rodriguez-Niedenfuhr M, et al. Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev* 2009;23:1177-82.
- (45) Mikaelian I, Malek M, Gadet R, Viallet J, Garcia A, Girard-Gagnepain A, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF-beta-independent mechanism. *Cancer Res* 2013;73:6621-31.
- (46) Murre C, Voronova A, Baltimore D. B-cell- and myocyte-specific E2-box-binding factors contain E12/E47-like subunits. *Mol Cell Biol* 1991;11:1156-60.
- (47) Gras B, Jacqueroud L, Wierinckx A, Lamblot C, Fauvet F, Lachuer J, et al. Snail family members unequally trigger EMT and thereby differ in their ability to promote the neoplastic transformation of mammary epithelial cells. *PLoS One* 2014;9:e92254.
- (48) Baker BW, Boettiger D, Spooncer E, Norton JD. Efficient retroviral-mediated gene transfer into human B lymphoblastoid cells expressing mouse ecotropic viral receptor. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5234.
- (49) Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997;15:871-5.
- (50) Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8033-7.
- (51) Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363-7.

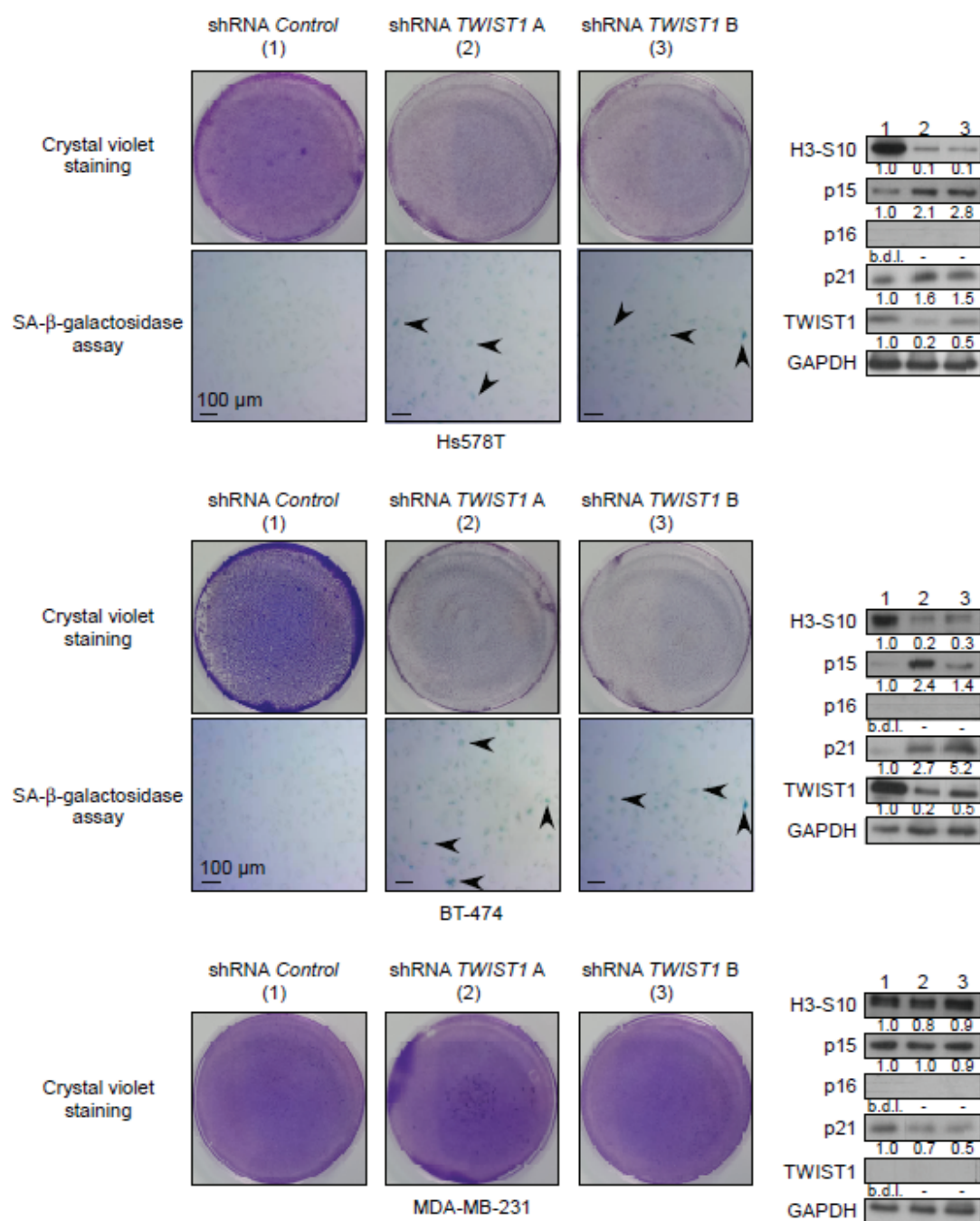


Figure S1

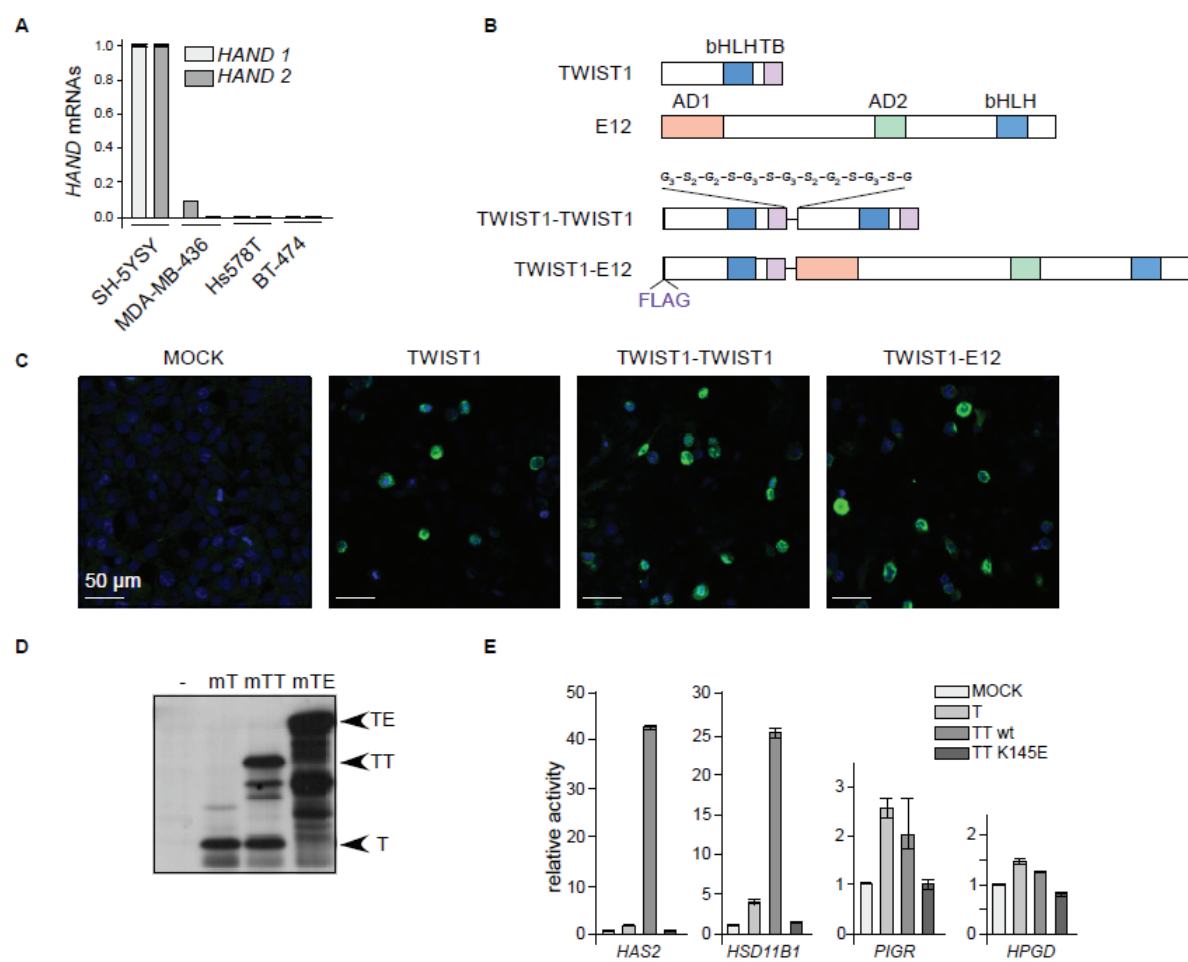
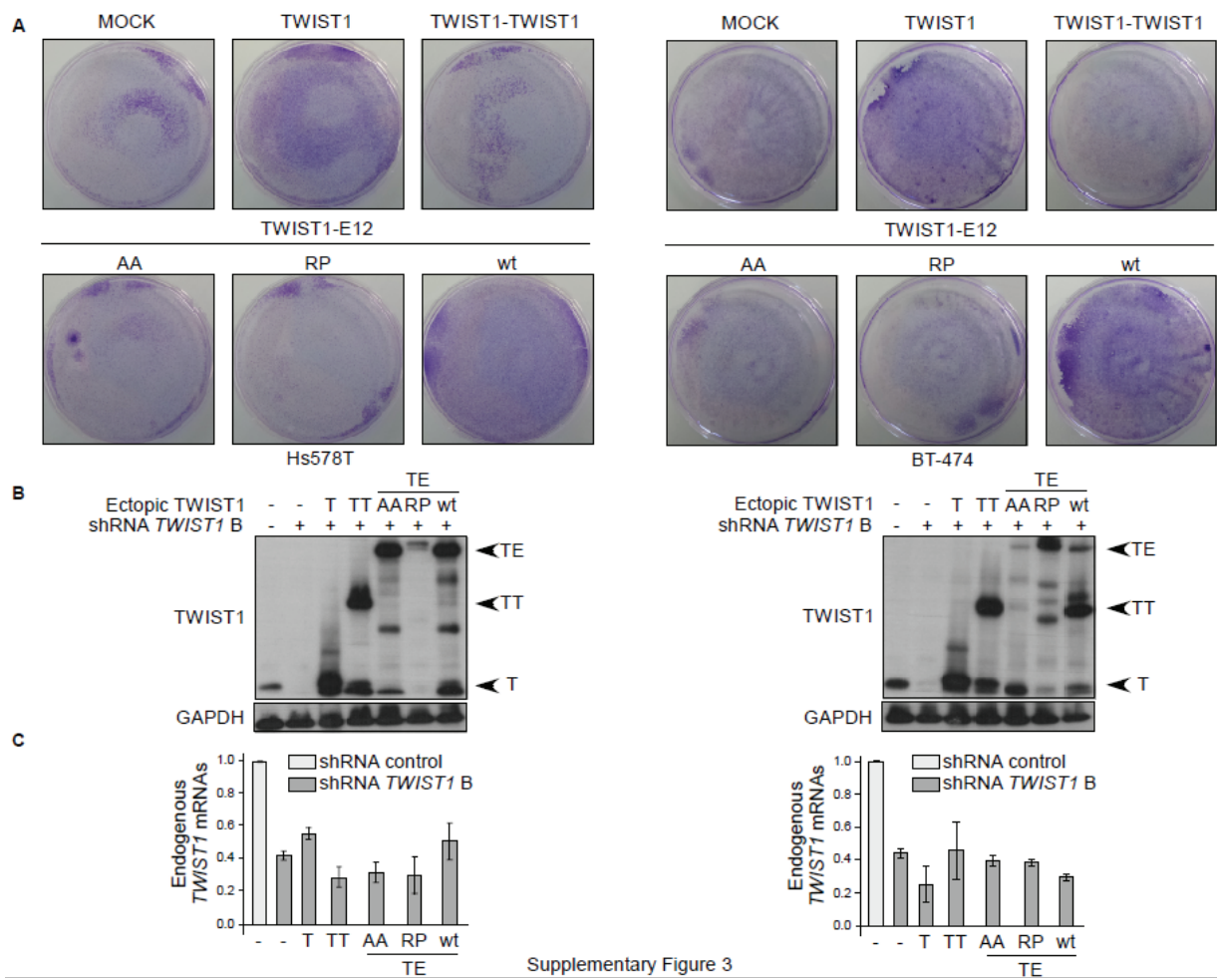
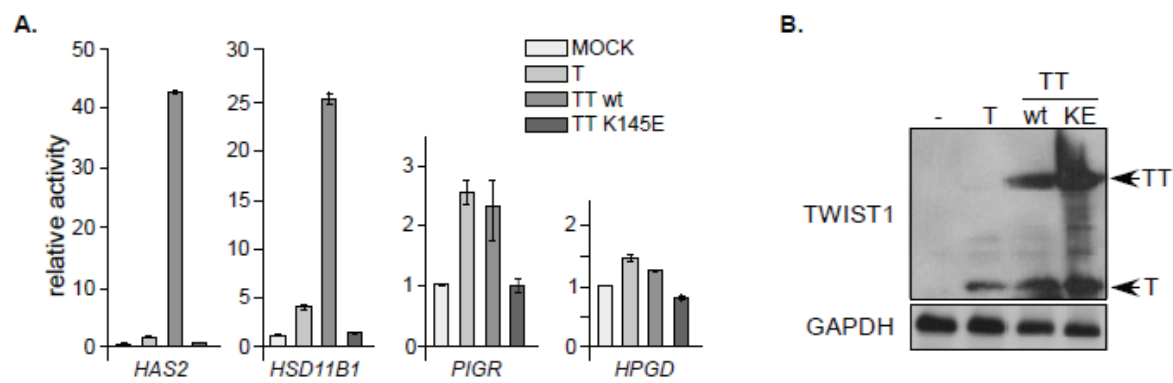


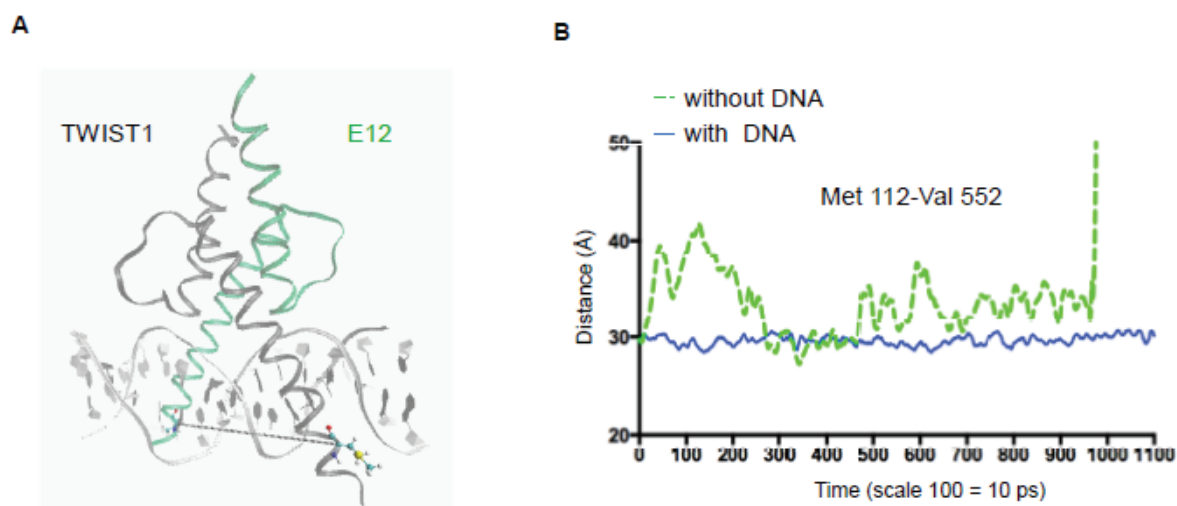
Figure S2



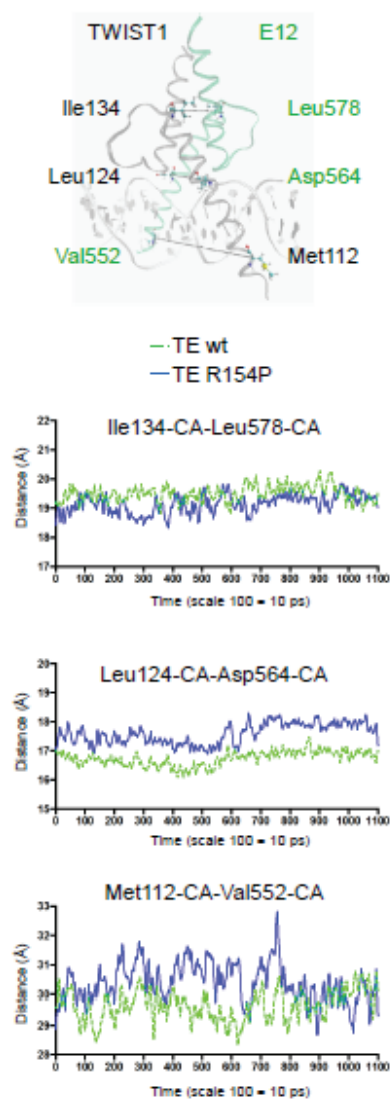
Supplementary Figure 3



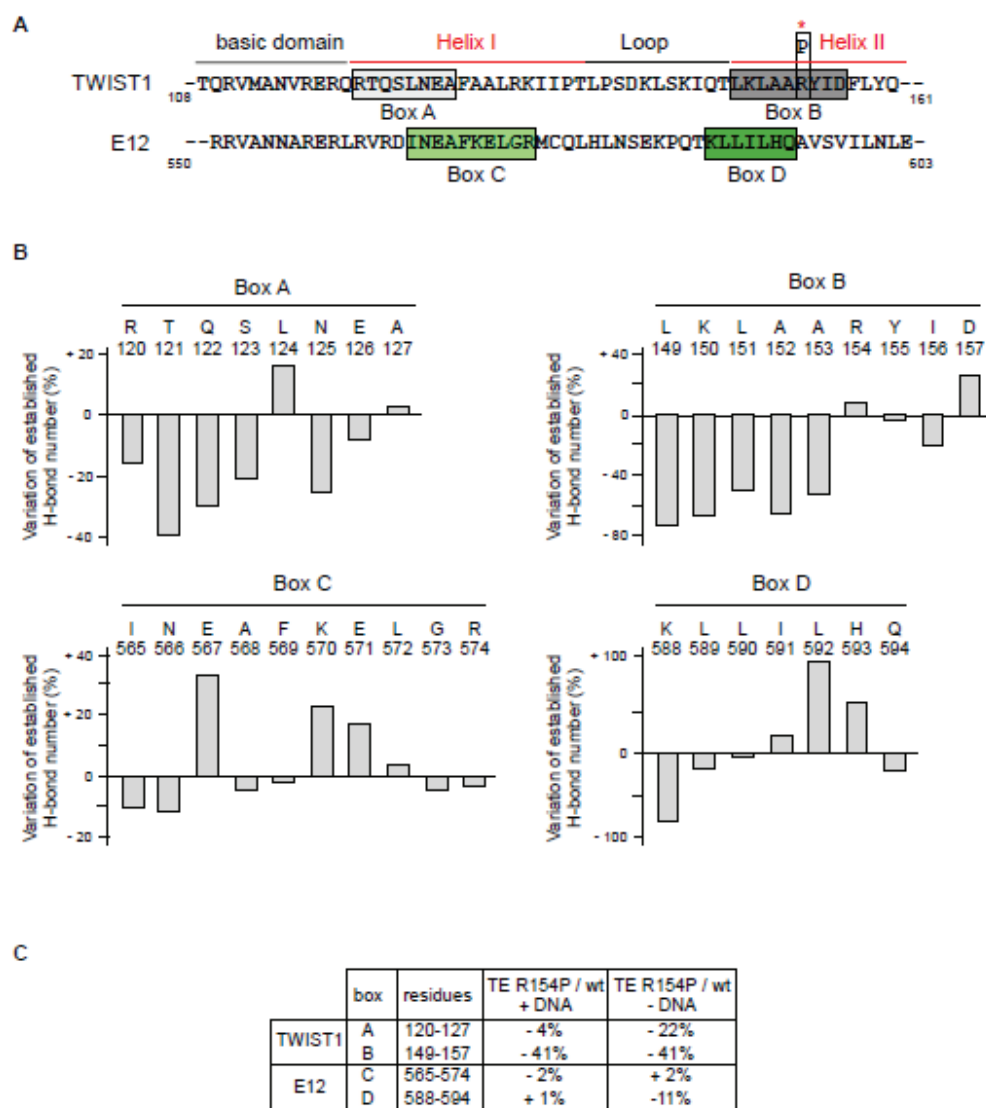
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

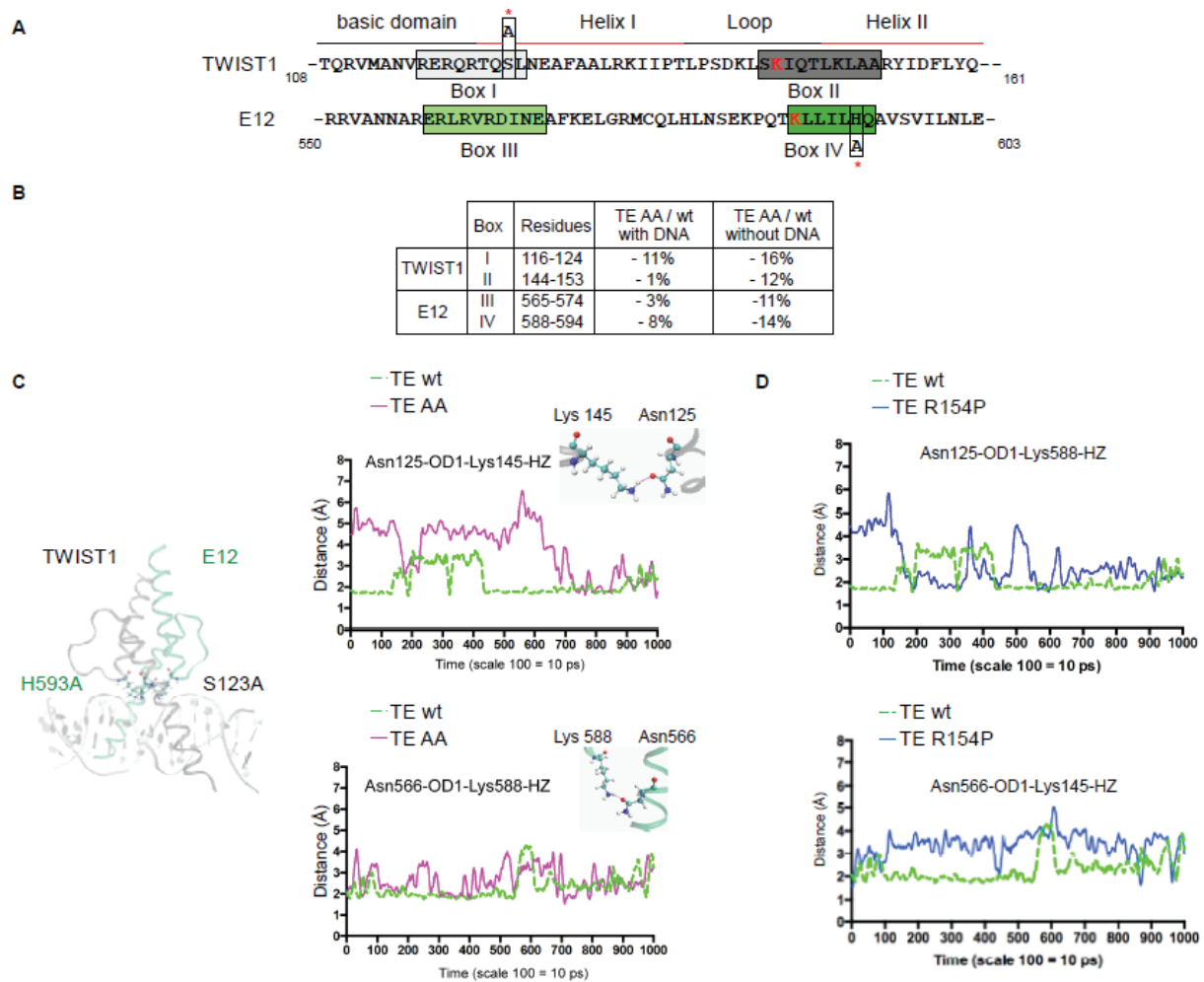


Supplementary Figure 6

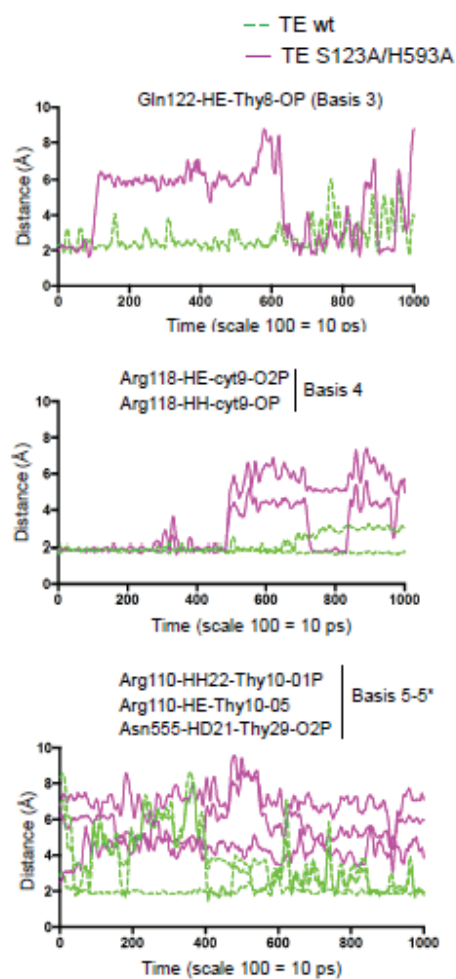


Supplementary Figure 7

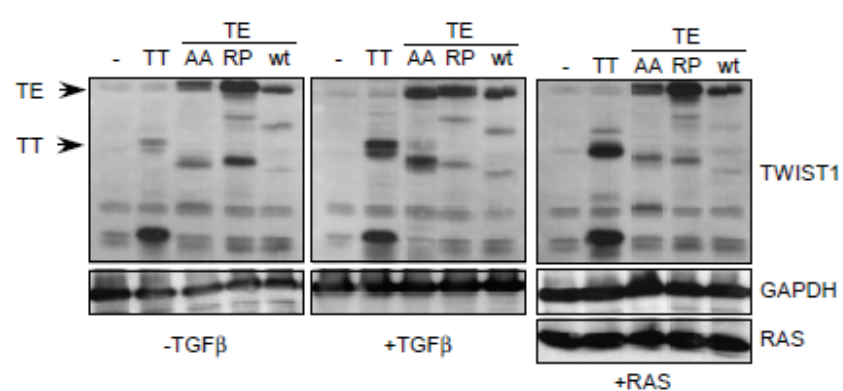




Supplementary Figure 8



Supplementary Figure 9



Supplementary Figure 10



Table 1

Transgene	Mouse #	tumor histological features	Number of tumors
TE	1	Carcinoma with fusiform and metaplastic cell compartments	2
	2	Carcinoma with fusiform and metaplastic cell compartments	1
	3	Carcinoma with malpighian and metaplastic cell compartments	1
	4	Adenocarcinoma with metaplastic cell compartments	1
	5	Carcinoma with glandular, malpighian, and metaplastic cell compartments	1
	6	Glandular and differentiated carcinoma	1
	7	<i>In situ</i> carcinoma glandular and malpighian	2
	8	<i>In situ</i> carcinoma glandular and malpighian	1
	9	Low grade <i>in situ</i> carcinoma malpighian Early malpighian metaplasia. Infiltrating glandular carcinoma grade 2	2
	10	Malpighian carcinoma	1
	11	Carcinoma with malpighian and metaplastic cell compartments	1
TT	1	Glandular and metaplastic carcinoma Metaplastic carcinoma	2
	2	Glandular adenocarcinoma	1
None	1	Fusiform carcinoma	1
	2	Carcinoma with glandular, malpighian, and metaplastic cell compartments	1

### Supplementary information

**The heterodimeric TWIST1-E12 complex drives the oncogenic potential of TWIST1 in human mammary epithelial cells.**

Laurent Jacqueroud, Charlotte Bouard, Geoffrey Richard, Mojgan Devouassoux-Shisheboran, Raphael Terreux, Audrey Pierrot, Douglas B. Spicer, Julie Caramel, Léa Payen, Alain Puisieux, Agnès Tissier, Stéphane Ansieau.

***In silico* analysis of the structural consequences of the R154P or S123A H593A substitutions on the TWIST1-E12 /DNA complex**

The *in silico* structural models were carried out in the presence of DNA (canonical E-box) that is expected to strongly stabilize the dimer structure during the molecular dynamics simulation. As dimerization precedes the binding to DNA (1), we could have conducted molecular dynamics simulations in the absence of DNA. However, such a possibility was technically excluded, with protein structure being particularly unstable in the absence of DNA (Supplementary Fig. 5), which would have outweighed the structural impact of the punctual mutation. The instability of the basic domain is particularly observed at the extremity of the  $\alpha$ -helices between the Met112 residue of TWIST1 and the Val552 of E12 (Supplementary Fig. 5A). As shown in Figure S5B, the distance between the two residues is constant (about 30 Å) in the presence of DNA, while highly variable in absence of it.

The R154P substitution induces a modification of the position of the basic domain within the DNA groove. It is visualized by the altered spacing between TWIST1 and E12 residues, either increased (as between the TWIST1 Met112 and E12 Val552 and the TWIST1 Leu124 and E12 Asp564 residues) in the bottom and the middle of the structure or shortened (as observed between the TWIST1 Ile134 and E12 Leu578 residues) in the top of the structure (Supplementary Fig. 6). Consequently, the contact between the basic domain and the E-Box cis-regulatory element is expected to be largely disrupted.

We next examined the consequences of the R154P substitution on the structure of the  $\alpha$ -helices of TWIST1 and E12 by assessing the stability of intramolecular H-bonds established between residues within these helices and between these residues and DNA bases (even if we know that correct dimerization is a prerequisite to DNA binding). We defined structural determinants essential for protein dimerization that consist of a series of residues termed Boxes A (residues 120 to 127) and B (residues 149 to 157) in TWIST1 and Boxes C (residues 565 to 574) and D

(residues 588 to 594) in E12 (Supplementary Fig. 7A). Box A faces Box D and Box B faces Box C. These four boxes constitute the heart of the dimer. Reduction of the stability of the H-bonds involving each of the consecutive residues of these four boxes is shown in Supplementary Fig. 7B and the global impact on H-bonds established within these boxes is indicated in Fig. 2B. Alterations to the  $\alpha$ -helices destabilize the interaction of the two partners. However, when the H-bonds established between the residues of Boxes A and D and the DNA bases (marked in the figure as + DNA) are collectively considered, the impact of the R154P mutation is reduced (Supplementary Fig. 7C). This is due to an increased interaction between residues within Boxes A and D with DNA.

We next focused on the TWIST1 residue Ser123, its substitution into Trp being associated with the Saethre-Chotzen phenotype (2). The residue was found to be located within the vicinity of the residue H593 of E12 (Fig. 2D). As observed during the molecular dynamics simulation, the phosphorylation of the residue reduces the distance between the  $\alpha$ -helices and DNA, likely strengthening the specificity of the heterodimeric complex for the E-boxes (C. B. and L. P., in preparation). We thus assessed consequences of the substitution of these two residues into Ala (mutations S123A in TWIST1 and H593A in E12). The double mutation impacts on the stability of H-bonds mainly established between a series of adjacent residues located within the basic domain-helix I junction and the loop-helix II junction that we named Boxes I (residues 116 to 124) and II (residues 144 to 153) in TWIST1 and III (residues 557 to 566) and IV (588 to 594) in E12 (Figure S8A). As observed with the R154P mutation, when the H-bonds established between the residues and the DNA (marked in the figure as + DNA) are considered collectively the destabilization is minimized (Supplementary Fig. 8B). Strikingly, both S123A H593A and R154P mutations similarly impact on the position of the lateral chains of the TWIST1 Lys145 and corresponding E12 Lys588 residues, reported as determinant for the DNA binding properties of



the TWIST1-E12 complex (3, 4). This was demonstrated by the destabilization of the H- established by these residues with the E12 Asn566 and TWIST1 Asn125 residues, respectively (Supplementary Fig. 8C). Consequently, the double S123A H593A mutation increases the distances between the TWIST1 (Arg118, Gln122 and Arg110) and the E12 (Asn555) residues located in the basic domain and shown to be directly involved in the binding to the E-box, as assessed in a dynamics simulation (Supplementary Fig. 9). As a consequence, the binding of the complex to the E-box cis-regulatory element is reduced.

### **Supplementary Figure legend**

#### **Supplementary Figure 1: Depletion in TWIST1 reactivates latent OIS in breast cancer cells**

TWIST1-positive Hs578T and BT-474 or TWIST1-negative MDA-MB-231 breast cancer cells were depleted in TWIST1 through RNA interference (shRNA *TWIST1* A or B as indicated on top). Left panels: Two days post-infection, cells were seeded at low density and stained 3 days later with crystal violet or assessed for their SA- $\beta$ -galactosidase activity. Right panels: analysis of Ser10-histone H3 (H3-S10), p15<sup>INK4B</sup> (p15), p16<sup>INK4A</sup> (p16), p21<sup>CIP1</sup> (p21), and TWIST1 by Western-blotting (relative signal quantification with respect to shRNA *Control* infected cells is indicated). b.d.l. means below the detection limit.

#### **Supplementary Figure 2: Description of the heterodimeric complexes generated.**

**A**, *HAND* transcripts are undetectable in all three TWIST1-dependent breast cancer cell lines. Levels were expressed relative to the housekeeping *HPRT1* gene transcript and were normalized with respect to the HAND-positive neuroblastoma cell line SH-5YSY  $\pm$  SD of triplicates. **B**, Schematic description of TWIST1, E12 proteins (upper panels) and the TWIST1-TWIST1 and TWIST1-E12 tethered dimers generated. bHLH: basic helix-loop-helix domains, TB: Twist Box,

AD: activation domain. **C**, Expression and sub-localization analysis of the tethered dimers. HEK293T cells were transiently transfected with TWIST expression constructs as depicted on top and protein analyzed by immunofluorescence 24h post-transfection, using a monoclonal anti-FLAG antibody. Homodimeric and heterodimeric TWIST1 tethered dimers display a similar strict nuclear localization. **D**, The human TWIST1 forced dimers gave the same by-products as their murine counterparts. HEK293T cells were transiently transfected either with a murine (Myc)<sub>6</sub>-TWIST1 (mT), a murine (Myc)<sub>6</sub>-TWIST1-TWIST1 (mTT), or a murine (Myc)<sub>6</sub>-TWIST1-E12 (mTE) expression construct (5) and protein analyzed 24h post-transfection by Western-blotting using a monoclonal anti-TWIST1 antibody.

**Supplementary Figure 3: Fully active TWIST1-E12 heterodimeric complex is required to complement the endogenous TWIST1 function in sustaining Hs572T and BT-474 breast cancer cell proliferation.**

Hs578T (left panels) or BT-474 (right panels) breast cancer cells were sequentially infected with T, TT or TE (either wild type (wt) or AA or RP variants) retroviral expression vectors and depleted in endogenous TWIST1 through RNA interference (shRNA *TWIST1B*). **A**, Cells were seeded at low density 48h post-infection and stained with crystal violet 3 days later. **B**, Analysis of the ectopic TWIST1 protein. **C**, Expression analysis of the endogenous *TWIST1* by Q-RT-PCR. Levels were expressed relative to the housekeeping *HPRT1* gene transcript and were normalized with respect to uninfected cells  $\pm$  SD of triplicates.

**Supplementary Figure 4: The TWIST1 homodimer is functionally active.**

**A**, The wild type or an inactive DNA-binding mutant (K145E) of TT tethered dimers were stably produced in HMEC-hTERT cells and the expression of various endogenous *TWIST1* target genes

was assessed by Q-RT-PCR. mRNA levels were expressed relative to the housekeeping *HPRT1* gene transcript and were normalized with respect to HMEC-hTERT cells  $\pm$  SD of triplicates. **B**, TWIST1 protein analysis by Western-blot.

**Supplementary Figure 5: DNA stabilizes the *in silico* structural model of the heterodimeric TWIST1/E12 complex.**

**A**, Position of the Met112 residue of TWIST1 and Val552 of E12 in the heterodimeric TWIST1/E12 structure is shown in CPK representation. **B**, Evolution of the distance between the two residues during the molecular dynamics simulation.

**Supplementary Figure 6: The R154P mutation induces a profound alteration of the heterodimeric TWIST1/E12 structure.**

Evolution of the distances between the residues Met112, Leu124 and Ile134 of TWIST1 and the residues Val552, Asp564 and Leu578 of E12 respectively during the dynamics simulations. Position of the residues in the heterodimeric complex structure is shown in CPK representation on top.

**Supplementary Figure 7: The R154P mutation destabilizes the TWIST1-E12 heterodimeric complex.**

**A**, Position of the Boxes A to D in TWIST1 and E12 primary sequences. The R154P mutation is indicated with an asterisk. **B**, Analysis of the impact of the R154P mutation on H-bonds generated by each individual residue located in the four structural boxes (A to D) during the molecular dynamics simulations. Gains and losses are represented in %. **C**, Analysis of the consequences of the R154P mutation on the total number of H-bonds established between

residues within Boxes A to D with (+) or without (-) DNA considering the H-bonds established between residues located within Boxes A, C, and D, and the DNA bases.

**Supplementary Figure 8: The double S123A H593A mutation and the R154P mutation similarly impact on the position of the TWIST1 residue Lys145 and of the corresponding residue Lys588 in E12 that are essential for protein/DNA complex stability.**

**A**, Position of the Boxes I to IV in TWIST1 in E12 primary sequences. The position of the S123A and H593A mutations are indicated with asterisks. **B**, Analysis of the consequences of the double S123A H593A mutation on the total number of H-bonds established between residues within Boxes I to IV with (+) or without (-) considering the H-bonds established between residues located within Boxes A, C, and D, and the DNA bases. **C**, Left panel: position of the residues S123 and H593 in the structure is shown in CPK representation. Right panel: evolution of the distances between the residues Lys145 and Asn125 of TWIST1 and Lys588 and Asn566 of E12 during the dynamics simulation in both wild type (wt) and S123A H593A (AA) mutant TE complexes. **D**, evolution of the distances between the residues Lys145 and Asn125 of TWIST1 and Lys588 and Asn566 of E12 during the dynamics simulation in both wild type (wt) and R154P (RP) mutant TE complexes.

**Supplementary Figure 9: The double S123A H593A substitution alleviates the stability of H-bonds established between residues and DNA bases.**

Evolution of the distances between the residues Gln122, Arg118 and Arg110 of TWIST1 and Asn555 of E12 and the bases 3,4,5 and 5\* of the E-box during the dynamics simulation.

### **Supplementary Figure 10: Protein expression analysis**

Analysis of the TWIST1 protein in TWIST1-infected HMEC cells untreated (left panel), treated with TGF $\beta$  (middle panel) or infected with RAS (right panel) by Western-blot.

### **Supplementary Figure 11: Control for the specificity of the signal generated in a Proximity Ligation Assay for the TWIST1-E12 heterodimeric complex.**

Assessment of the TWIST1-E12 heterodimeric complex by a Proximity Ligation Assay in the TWIST1 and E12 positive basal A/basal-like MDA-MB-436 and the basal B/ claudin-low Hs578T, and, as a control, the TWIST1-negative E12-positive HMEC-hTERT cell line. Specificity of the signal was confirmed by inhibiting either *TWIST1* (shRNA *TWIST1*) or *TCF3* (E2A protein encoding gene) expression through RNA interference. **A**, Analysis of TWIST1 and E12/E47 proteins by Western-blot. **B**, Expression of *TWIST1* and *E12*, as assessed by Q-RT-PCR. mRNA levels were expressed relative to the housekeeping *HPRT1* gene transcript and were normalized with respect to HMEC-hTERT cells. **C**, Assessment of the TWIST1-E12 heterodimeric complex by a Proximity Ligation Assay. Average value for the number of dots detected per cell and the number of cells counted (n) are indicated.

### **Supplementary Table 1: Histological features of the TWIST1 mice-derived breast carcinomas**

### **References**

- (1) Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison SC. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* 1994;8:970-80.
- (2) Kress W, Schropp C, Lieb G, Petersen B, Busse-Ratzka M, Kunz J, et al. Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006;14:39-48.

- (3) El G, V, Legeai-Mallet L, Benoist-Lassel C, Lajeunie E, Renier D, Munnich A, et al. Mutations in the basic domain and the loop-helix II junction of TWIST abolish DNA binding in Saethre-Chotzen syndrome. *FEBS Lett* 2001;492:112-8.
- (4) Bouard C, Terreux R, Hope J, Chemelle JA, Puisieux A, Ansieau S, et al. Interhelical loops within the bHLH domain are determinant in maintaining TWIST1-DNA complexes. *J Biomol Struct Dyn* 2014;32:226-41.
- (5) Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Muentener C, Mercado MA, Spicer DB. Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev Dyn* 2006;235:1345-57.

## **5ème partie : Discussion**



### *Etude de la contribution relative des deux complexes TWIST1 dans la carcinogenèse mammaire.*

La capacité des protéines TWIST à neutraliser les mécanismes de sauvegarde cellulaire constitue sans nul doute l'une des composantes déterminantes par lesquelles ces facteurs embryonnaires favorisent l'initiation tumorale. Les expériences d'inhibition de l'expression de *TWIST1* par ARN interférence, que nous avons menées dans divers lignées tumorales mammaires (de sous-type luminal ou claudin-low), confirment ces précédentes observations. En effet, l'expression de la protéine TWIST1 semble être un prérequis au maintien de la prolifération des cellules tumorales *in vitro* mais également *in vivo* (Ansieu et al., 2008; Tran et al., 2012). En cela, ces cellules tumorales présentent une addiction à la protéine TWIST1, et ce malgré l'accumulation d'altérations secondaires et la présence, dans les lignées « claudin-low » connues pour être enrichies en marqueurs de l'EMT, d'autres facteurs de transcription embryonnaires tels que la protéine ZEB1 capable également d'inhiber l'expression d'inhibiteur de cyclines-kinases (Browne et al., 2010; Liu et al., 2008). Il n'existe, pour l'heure, aucune donnée pouvant expliciter l'absence de redondance fonctionnelle entre ces deux FTE au regard de l'inhibition de la sénescence. Les FTE formant un réseau fortement interconnecté et complexe, il est envisageable que la déplétion de la protéine TWIST1 conduise à une restructuration des équilibres entre les FTE et leurs régulateurs aboutissant à une inhibition de fonctions des protéines ZEB1 au regard de la sénescence. Dans le cas de la protéine ZEB1, l'inhibition de son expression par le miR-200 restaure le phénomène de sénescence (Magenta et al., 2011). Or, la protéine p53 induit l'expression du miR-200 conduisant à une répression de l'expression de *ZEB1*, pérennisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Sánchez-Tilló et al., 2012). Dans le contexte de la déplétion de la protéine TWIST1 en présence d'une activité sauvage de la protéine p53, on peut imaginer que la levée de l'inhibition de p53 par TWIST1 rende possible l'activation du miR-200 et l'extinction conséquente de *ZEB1*, expliquant ainsi l'impossibilité de ce dernier à maintenir le phénomène de sénescence. Cette hypothèse reste à être confirmée. Pour autant, les lignées mammaires analysées pendant ma thèse arborent pour une grande majorité d'entre-elles des mutations inactivatrices de la protéine p53. Par ailleurs, il existe de plus en plus d'études mettant en avant l'existence d'une coopération temporelle et spatiale des FTE pouvant expliquer l'absence de compensation de la déplétion de la protéine TWIST1 par d'autres FTE (Dave et al., 2011; Takahashi et al., 2004; Tran et al., 2011). En effet, on peut penser que les protéines TWIST1 et ZEB1 jouent des rôles différents dans l'inhibition de la sénescence; l'une d'avantage dans l'initiation, l'autre dans le

maintien de cette inhibition. En outre, il a été démontré que la déplétion de la protéine TWIST1 dans des lignées tumorales humaines de colon, conduit à une diminution de l'expression ou un retard de l'expression en réponse au TGF- $\beta$  du gène *ZEB1* (Dave et al., 2011). Il est également envisageable que le type cellulaire ou les voies de signalisation activées dictent l'activité de l'une ou l'autre de ses protéines. L'addiction à l'un ou l'autre de ces facteurs pourrait ainsi dépendre de la nature de l'évènement génétique à l'initiation de la transformation (« driver mutation »). Plusieurs exemples de mutations géniques capables directement de moduler l'expression des facteurs de transcription embryonnaires existent. Dans le pancréas, la forme activée de la protéine K-RAS (KRAS<sup>G12V</sup>) induit l'expression de *Twist1*, s'affranchissant ainsi de l'activation du gène *CDNK2A* et l'entrée des cellules en sénescence répllicative et les cellules restent dépendantes du facteur de transcription pour leur survie (Lee and Bar-Sagi, 2010). Dans les neuroblastomes, le gène *Twist1* s'avère également être une cible directe de l'oncoprotéine N-MYC (Selmi et al., 2014) et le facteur embryonnaire est indispensable à la survie des cellules.

Une alternative serait évidemment que certaines fonctions de TWIST1 lui soient spécifiques. On peut souligner par exemple que les protéines TWIST modulent la capacité de la protéine p65RelA à activer un certain nombre d'interleukines (Li et al., 2012b; Šošić et al., 2003), nombreuses d'entre elles étant associées au SASP et nécessaires de fait au maintien du phénotype sénescence (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008; Li et al., 2012a; Šošić et al., 2003; Su et al., 2011; Wang et al., 2013). Enfin, évidemment, l'importance relative de ses facteurs selon le modèle cellulaire étudié pourrait être le reflet de la présence ou non de cofacteurs et complexes de remodelage chromatinien essentiels à leur activité.

En outrepassant la sénescence induite en réponse à une activation oncogénique, l'expression de la protéine TWIST1 représente l'un des évènements précoces pouvant mener à l'évolution de lésions pré-malignes vers un stade malin. En lien avec cette observation, nous avons montré successivement que la protéine TWIST1 est absente des nevi et à l'inverse présente dans les mélanomes primaires (avec une expression inversée à celle de la protéine p16INK4A) (Ansieau et al., 2008). Par ailleurs, dans le cadre du cancer du sein, la protéine est détectée dans les lésions précoces que représentent les carcinomes ductaux *in situ* (DCIS), stade auquel la cascade métastatique n'est pas initiée, confortant une fois de plus l'idée selon laquelle la protéine TWIST1, au-delà de ses fonctions pro-métastatiques, est dotée de propriétés

oncogéniques (Morel et al., 2012). Mon travail de thèse renforce ces données en montrant, par la technique de « Proximity Ligation Assay » que le complexe actif de la protéine TWIST1, à savoir le complexe hétérodimérique TWIST1-E12 (complexation des protéines TWIST1 et E2A endogènes) est détectable à ce stade de la progression tumorale mammaire. La démonstration de l'activité oncogénique de la protéine TWIST1 avait été obtenue en réalisant des tests de coopération oncogéniques avec la protéine KRAS<sup>G12D</sup> *in vitro* mais également dans un modèle de carcinogénèse mammaire à l'aide de souris transgéniques (Morel et al., 2012). Leur expression conjointe dans des cellules luminales (expression du transgène induite par le promoteur WAP-Cre), en absence de lactation permettant ainsi une expression en mosaïque plus fidèle aux observations physiopathologiques, conduisait, avec une pénétrance complète, au développement de carcinomes mammaires (Morel et al., 2012).

Mes travaux complètent ces données en démontrant *in vitro* que la capacité à neutraliser le mécanisme de sauvegarde et à coopérer avec l'oncoprotéine RAS est restreinte à l'hétérodimère TWIST1-E12, tout au moins dans ce modèle. Par ailleurs, *in vivo* l'expression de l'hétérodimère dans les cellules luminales mammaires octroie aux souris une susceptibilité exacerbée à développer spontanément des carcinomes mammaires (39,2% ; n=28), en comparaison à des souris contrôles ou exprimant l'homodimère (14,2% ; n=14). La latence importante (18 mois) et l'hétérogénéité des tumeurs obtenues reflètent la nécessité d'évènements secondaires afin de permettre une transformation néoplasique complète. Par ailleurs, ces tumeurs sont obtenues en ayant pris soin d'induire l'expression du transgène dans l'intégralité des cellules luminales, en utilisant des souris multipares (deux cycles de lactation). Si ces conditions s'éloignent des conditions physiologiques, elles reflètent néanmoins la capacité des protéines TWIST1 à générer un terrain fertile au développement de tumeurs. Ces données confortent une nouvelle fois l'idée selon laquelle, la protéine TWIST1 en soi ne constitue pas un oncogène puissant mais permet d'avantage aux cellules de tolérer des activations oncogéniques et d'évoluer vers un phénotype malin. A ce titre, l'expression forcée de TWIST1 dans les cellules épithéliales ne leur octroie aucun pouvoir transformant.

A l'origine, la protéine TWIST1 a été décrite par le laboratoire du Dr. Weinberg comme un facteur pro-métastatique de par sa capacité à promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse (Yang et al., 2004). Dans nos mains, à l'inverse des protéines SNAIL et ZEB,

la protéine TWIST1, ou sa forme oncogénique, sont incapables de promouvoir l'engagement de cellules épithéliales mammaires immortalisées dans un programme d'EMT de manière totale. Tout au plus peut-on noter la capacité de la protéine TWIST1 à promouvoir l'expression de certains marqueurs mésenchymateux. Cette observation est en accord avec un rôle du facteur de transcription davantage dans le maintien d'un phénotype mésenchymateux que dans l'induction du programme (Tran et al., 2011). Il est néanmoins notable que l'expression de la protéine TWIST1 ou de l'hétérodimère sensibilise les cellules à un environnement permissif à l'EMT (traitement au TGF $\beta$ ) : conditions retrouvées sur les fronts invasifs des tumeurs (Brabletz et al., 2001). A cet égard, l'expression de TWIST1 est clairement associée à un risque métastatique élevé dans différents modèles tumoraux tels que le mélanome (Hoek et al., 2004) et la prostate (Gajula et al., 2013).

Afin de valider l'importance de l'interaction entre les protéines TWIST1 et E12 dans les fonctions oncogéniques de la protéine TWIST1, nous avons généré deux mutants capables d'inhiber la dimérisation entre les deux partenaires soit la fixation du complexe à l'ADN. Des données bibliographiques ont démontré l'importance du résidu Arg154 et les conséquences de sa mutation en résidu Pro sur l'efficacité de dimérisation du complexe TWIST1-E12 (Spicer et al., 1996). Nous avons confirmé que la mutation R154P conduit effectivement à une distorsion significative de la structure entraînant une déstabilisation de la stabilité du complexe et abolit l'interaction entre les deux protéines TWIST1 et E12, à en juger par des expériences de co-immunoprécipitation. Parallèlement, nous nous sommes intéressés au résidu Ser 123 de la protéine TWIST1, sa phosphorylation déterminant la balance de formation entre l'homo- et l'hétérodimère (Firulli et al., 2005). De plus, sa substitution en résidu Trp est associée à la perte de fonctions de TWIST1 dans le cadre du syndrome de Saethre-Chotzen (Seifert et al., 2006). Comme observé au cours des dynamiques moléculaires, la phosphorylation du résidu réduit la distance entre les hélices de la protéine et l'ADN, renforçant ainsi la spécificité du complexe pour son site de fixation. D'après le modèle *in silico*, le résidu Ser123 interagit avec le résidu His593 de la protéine E12. Nous avons donc évalué les conséquences de la substitution de ces deux résidus en Ala (mutations S123A dans TWIST1 et H593A dans E12). La présence de cette double mutation augmente la distance entre certains résidus du complexe directement en contact avec la séquence d'ADN cible, inhibant ainsi l'efficacité de fixation. Comme attendu, bien que correctement ciblées dans le noyau, les deux versions mutées sont inactives à en juger par des

expériences de gènes rapporteurs. L'incapacité de ceux deux mutants à compléter l'activité anti proliférative et pro-EMT de la protéine TWIST1 démontre la nécessité d'une interaction non altérée entre les deux partenaires de l'hétérodimère. Cette analyse structurale et fonctionnelle valide donc à la fois le modèle structural établi *in silico* et la relevance de nos tests fonctionnels.

Nos travaux démontrent que l'hétérodimère représente la forme active de la protéine TWIST1 endogène au regard de la transformation néoplasique. Pour autant, plusieurs interrogations subsistent. En effet, rien n'indique que l'hétérodimère constitue l'unique complexe oncogénique de la protéine TWIST1 et que certaines de ses fonctions soient allouées à un complexe différent impliquant un équilibre spatio-temporel des deux formes. De plus, aucune donnée bibliographique ou résultat obtenu ne nous permet de prétendre que l'inhibition de l'hétérodimère soit suffisante pour restaurer de la sénescence et qu'il constitue une approche thérapeutique de choix. Plus encore, rien ne nous permet aujourd'hui d'exclure que dans d'autres modèles tumoraux, d'autres complexes correspondent à la forme active de la protéine TWIST1. En effet, contrairement aux lignées cellulaires mammaires utilisées dans nos études, certaines lignées, notamment celles de neuroblastome, expriment des protéines HAND, autres partenaires des protéines TWIST1. Au vu des données obtenues en embryologie, il n'est donc pas absurde d'envisager la formation d'un hétérodimère TWIST1-HAND1 ayant des fonctions particulières au sein des cellules de neuroblastome (Firulli et al., 2005). Parallèlement, de nombreuses lignées mammaires du sous-type claudin-low expriment également la protéine TWIST2. Même si l'existence d'un complexe TWIST1/TWIST2, ou TWIST2-E12, reste à démontrer, certaines fonctions pourraient leur être attribuées. Pour rappel, le laboratoire a démontré que la protéine TWIST2 récapitule les fonctions oncogéniques de la protéine TWIST1. En effet, la délétion de la protéine TWIST2 dans des lignées cellulaires transformées mammaires ou de mélanomes, conduit de manière similaire à TWIST1, à l'induction du phénomène de sénescence. En outre, l'expression de la protéine TWIST2 permet l'échappement de la sénescence induite en réponse à une activation oncogénique de type RAS et coopère avec cette activation oncogénique pour induire la transformation de cellules épithéliales mammaires humaines au travers du phénomène d'EMT (Ansieau et al., 2008). Cependant, une nouvelle fois, l'inhibition de l'expression de *TWIST1* étant suffisante dans les lignées claudin-low exprimant les deux membres de cette même famille, l'implication de la protéine TWIST2 peut être relativisée.

Afin de s'assurer de l'efficacité d'une stratégie visant à inactiver l'hétérodimère, nous avons généré une forme transdominante négative de l'hétérodimère (Corsi et al., 2002). La mutation de l'acide glutamique en position 29 en résidu lysine (E29K) conduit chez *C.Elegans* à un phénotype mimant celui d'une perte de fonction de la protéine TWIST1. La mutation n'abolit ni la capacité de la protéine à s'homo- ou s'hétérodimériser, ni la localisation nucléaire de la construction et la capacité de se fixer à l'ADN. Cette région est hautement conservée entre les espèces, ce qui nous a permis de générer l'équivalent humain du mutant (E117K) dans la protéine monomère ainsi que l'hétérodimère. Nous évaluerons la capacité de ce transdominant négatif à induire, dans des lignées mammaires, de mélanomes ou encore de neuroblastome, les systèmes de sauvegarde cellulaires, validant ainsi la relevance d'une stratégie ciblant le complexe TWIST1-E12.

Sachant que l'expression transcriptionnelle de TWIST1 n'est pas le reflet de la protéine (régulations post-transcriptionnelles), ni celui de son activité (modifications post-traductionnelles), nous avons voulu mettre à profit nos hétérodimères pour tenter d'identifier une signature génique qui pourrait être le reflet de l'activité de la protéine. L'idée sous-jacente était que l'utilisation de dimères forcés pouvait nous prémunir des problèmes de titrations, les réactions intramoléculaires étant favorisées aux dépens des réactions intermoléculaires. L'expression ectopique de ces dimères pourrait donc plus facilement nous amener à identifier les gènes cibles directes de TWIST1. Ces signatures géniques ont été réalisées à des temps précoces afin de s'affranchir d'activations transcriptionnelles secondaires. A notre surprise, l'expression de très peu de gènes s'est avérée modifiée et aucun ne semblait avoir de relevance biologique significative au regard de la transformation. L'absence d'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine ou la fibronectine, nous suggère potentiellement que le temps choisi était trop précoce. L'autre possibilité, au vue des expériences de coopération avec l'oncoprotéine RAS *in vitro* et la nécessité d'accumulation d'évènements secondaires dans la transformation néoplasique *in vivo*, ces signatures pourraient être réalisées à des temps précoces mais cette fois en présence d'un oncogène du type RAS et à des temps où les cellules arborent un potentiel transformant en agar mou, possibilité qui sera évaluée.

### *TWIST1 cible thérapeutique ?*

Au vue de nos premiers résultats, l'altération de l'activité du complexe hétérodimérique TWIST1-E12 pourrait constituer une approche viable, du moins dans un modèle de tumorigenèse mammaire dans un premier temps. Ce potentiel est renforcé par les observations *in vitro* et *in vivo* faisant état d'une addiction de certaines cellules tumorales à la protéine TWIST1 (Ansieau et al., 2008; Tran et al., 2012; Valsesia-Wittmann et al., 2004). De plus, des études combinant paclitaxel et un shRNA dirigé contre l'ARNm *TWIST1* permettent la diminution du potentiel métastatique ainsi qu'une diminution du développement tumoral dans un modèle *in vivo* de xénogreffes (Shen et al., 2013). Même si la thérapeutique par siRNA soulève de grands espoirs, les obstacles restent cependant nombreux. Ces derniers ne conduisent pas forcément à l'effet thérapeutique voulu à cause d'une faible stabilité dans le flux sanguin, une mauvaise absorption intracellulaire ainsi qu'une activation non spécifique du système immunitaire. Malgré les efforts réalisés dans le domaine de la galénique (formulation furtive), l'utilisation d'ARN interférents *in vivo* reste cependant difficile. Ces observations/difficultés renforcent le rationnel d'un ciblage plus spécifique de l'hétérodimère, à l'aide de molécules/stratégies plus conventionnelles. Dans cette optique, des analyses *in silico* sont actuellement en cours pour identifier des molécules chimiques susceptibles d'en moduler spécifiquement l'activité, les tests fonctionnels établis au cours de ma thèse *in vitro* permettant ensuite d'évaluer leur efficacité (L.Payen, résultats non publiés). Le modèle structural établi *in silico* met particulièrement en exergue l'importance de boucles latérales pour le maintien du complexe protéine/ADN. Ces boucles pourraient être accessibles et constituer des cibles de choix.

Certains points restent cependant à prendre en compte. En effet, deux articles publiés dans le prestigieux journal *Cancer Cell* ont démontré que l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription embryonnaires et la MET associée est une étape indispensable à l'établissement de foyers tumoraux secondaires (Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012). En particulier, l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription embryonnaires, au vu de leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire (Vega et al., 2004), pourrait être un prérequis à la colonisation. Des mesures de Ki67 ont confirmé que les cellules de la tumeur primaire possède une faible prolifération corrélée à une forte expression de la protéine TWIST1 alors que les cellules présentent sur le site secondaire arborent une perte d'expression de TWIST1 accompagnée d'un gain en prolifération (Tsai et al., 2012). Cette apparente ambivalence entre induction du



phénomène de sénescence et dissémination métastatique en réponse à l'inhibition de l'expression du gène *TWIST1* est sans doute le reflet d'un concept émergent, basé sur une dualité de fonctions des inducteurs d'EMT en fonction de niveaux d'expression distincts (Beck et al., 2015; Liu et al., 2014). On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle un fort taux de protéine est nécessaire à l'échappement aux systèmes de sauvegardes et à l'induction de l'EMT, qu'un taux plus faible soit nécessaire à la mise en place des foyers tumoraux secondaires et que la réinduction des phénomènes de sénescence ou d'apoptose nécessite des taux d'extinctions plus importants. En d'autres termes, une stratégie visant ces facteurs ne sera effective que si elle conduit à une inactivation très forte voir complète de ces protéines (Tran et al., 2012).

Une des indications préférentielles d'une stratégie visant la protéine TWIST1 pourrait donc être le traitement des tumeurs primaires afin d'éviter l'effet prométastatique d'une inhibition de la protéine. Cependant, la grande majorité des décès étant dus aux métastases, on peut se poser la question de l'utilité d'une telle stratégie. Or, un traitement « anti-FTE » néo-adjuvant en combinaison aux molécules plus conventionnelles, pourrait éviter l'apparition de cellules tumorales ayant subi une EMT totale et donc susceptibles d'initier la cascade métastatique et des phénomènes de résistances conduisant à des phénotypes plus agressifs et à une possible récurrence. Dans ce cadre-là, le laboratoire prend part à une collaboration ambitieuse au sein d'un consortium Franco-Allemand/public-privé visant à développer un screening moléculaire à haut débit sur la base de modèles cellulaires développés par l'équipe. Le but de cette étude est de développer une molécule à fort potentiel ajutée, capable d'améliorer significativement la survie des patients ayant des lésions cancéreuses résiduelles après un traitement néo-adjuvant et une chirurgie en inhibant la capacité de ces cellules à subirent le phénomène d'EMT et de conduire à l'initiation de la cascade métastatique.

L'importante adaptabilité des cellules engagées dans un programme d'EMT et les difficultés conséquentes posent de nombreuses questions quant à la pertinence et l'efficacité de stratégies thérapeutiques visant ce programme de transdifférenciation (Jacqueroud L. L'EMT : de la plasticité à la chimiorésistance. Thèse d'exercice : Pharmacie : Lyon 1 ; 2013 » et « Jacqueroud L, Ansieau S. La transition épithélio-mésenchymateuse: de la plasticité à la chimiorésistance. Correspondances en Onco-Théranostic 2013 ; 3 : 126-31). Néanmoins, certaines des stratégies envisagées laissent entrevoir un espoir et même une forte présomption quant à leur faisabilité.

Les progrès qui sont réalisés dans le criblage et la conception rationnelle de nouvelles molécules devraient apporter rapidement de nouvelles solutions fiables dans l'optimisation de la prise en charge et la survie des patients. D'importants efforts sont faits pour améliorer les conditions de criblages en concevant des outils se rapprochant des conditions physico-chimiques de l'organisme et plus précisément du microenvironnement tumoral (Aref et al., 2013). Cependant, il subsiste encore bon nombre d'interrogations quant à l'utilisation de l'EMT en tant que cible. En effet, si la stratégie repose sur l'altération de l'inhibition des systèmes de sauvegarde cellulaires par les facteurs de transcription embryonnaires ou plus largement sur l'induction d'une MET, encore faut-il que les effets subsistent après le retrait de la molécule. Cette question est cruciale en termes de posologie et de fenêtre thérapeutique. Il est également nécessaire de réfléchir à une utilisation néo-adjuvante de ces thérapies, de récents travaux ayant mis en évidence l'induction d'une EMT au niveau des berges de la plaie lors de résection de tumeurs de l'œsophage notamment (Aoyagi et al., 2011, 2013). En effet, certains stress liés à la résection (hypoxie, ischémie, inflammation...) induisent l'expression de plusieurs marqueurs de l'EMT (TWIST, ZEB, vimentine, fibronectine), même si cette induction est également retrouvée lors de la résection de tissus sains, conduisant les auteurs à la question d'une possible contamination des échantillons tumoraux par du tissu mésenchymateux sains adjacents.

Cette notion de plasticité tumorale découlant de l'EMT ouvre la voie à un véritable rationnel du concept du théranostic basé sur le fait que l'hétérogénéité des pathologies tumorales requiert des solutions plus personnalisées. En effet, le théranostic améliore le pronostic et la sécurité des patients, en identifiant les populations de patients qui répondront favorablement aux molécules tout en préservant les autres d'effets indésirables sans aucun bénéfice thérapeutique. Cela permettra aux médecins de sélectionner les traitements les mieux adaptés, avec le meilleur rapport bénéfice-risque(-coût) en influençant positivement sur la sécurité du patient ainsi que sur l'économie de la santé. En amont, le théranostic permet aux laboratoires pharmaceutiques d'optimiser le processus de développement des médicaments en ciblant des cohortes plus significatives lors des essais cliniques. Ces avancées pour le patient et le système de santé sont rendues possibles par un certain nombre de progrès techniques et scientifiques. Que ce soit, initialement, le projet du génome humain ou la découverte de nouveaux biomarqueurs pronostiques, le domaine de la biologie a favorisé la compréhension des états pathologiques. De plus, le perfectionnement des techniques de génotypage ou encore de l'analyse des profils

d'expression géniques a permis l'application de ces nouvelles connaissances biologiques au développement de tests tout en faisant baisser leur coûts. En cela, je pense que les progrès les plus significatifs dans ces prochaines années seront faits sur le dépistage, la prise en charge précoce de la tumeur ainsi qu'une optimisation des stratégies thérapeutiques grâce au domaine du théranostic.

## **6ème partie : Annexes**

## **I. Snail family members unequally trigger EMT and thereby differ in their ability to promote the neoplastic transformation of mammary epithelial cells.**

Alors que les protéines SNAIL sont considérées comme étant de puissants inducteurs d'EMT, et en cela associées à la propagation métastatique des cellules tumorales, leur potentiel d'initiation de la transformation néoplasique, n'a jamais été discuté. Cependant, à l'instar des protéines TWIST1, on observe l'expression de la protéine SNAIL1 dans des DCIS bien avant l'initiation de la cascade métastatique, suggérant que SNAIL1 possède un potentiel oncogénique intrinsèque (Geradts et al., 2011). La production ectopique des trois membres de la famille SNAIL : SNAIL1, SNAIL2 et SNAIL3 dans des cellules épithéliales mammaires humaines immortalisées mais non transformées, nous a permis de démontrer que ces trois facteurs diffèrent dans leur capacité à promouvoir l'EMT. De cette capacité semble dépendre leur potentiel, d'une part à protéger les cellules de l'anoïkis et à promouvoir, d'autre part, seules ou en coopération avec l'oncoprotéine H-RAS<sup>G12V</sup> la transformation néoplasique des cellules. Ces données dans leur ensemble soulignent une fois de plus l'importance de l'EMT dans l'initiation tumorale. Ces résultats mettent par ailleurs en exergue le fait que la protéine SNAIL3 soit un faible inducteur d'EMT, arborant ainsi une divergence fonctionnelle vis à vis des deux autres membres de la famille. En accord avec cette hypothèse, la protéine semble, au cours du développement embryonnaire murin, être spécifiquement exprimée dans le thymus, les muscles squelettiques mais sur aucun des sites sur lesquels l'EMT est présumé jouer un rôle (Zhuge et al., 2005). Les fonctions exactes de SNAIL3 restent à ce jour que très peu décrites.

Nos résultats mettent en évidence pour la première fois un rôle fonctionnel du gène SNAI3 dans l'acquisition de propriétés pro-tumorales *in vitro* dans le contexte mammaire. Des études supplémentaires seront néanmoins nécessaires afin de confirmer ces observations et les étendre à d'autres types tumoraux et en particulier aux tumeurs d'origine hématopoïétiques au vu du possible rôle de la protéine SNAIL3 dans la différenciation lymphocytaire.

# Snail Family Members Unequally Trigger EMT and Thereby Differ in Their Ability to Promote the Neoplastic Transformation of Mammary Epithelial Cells

Baptiste Gras<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>, Laurent Jacquaroud<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>, Anne Wierinckx<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>, Christelle Lamblot<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Frédérique Fauvet<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Joël Lachuer<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>, Alain Puisieux<sup>1,2,3,4,5,6,8\*</sup>, Stéphane Ansieau<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>

**1** Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France, **2** CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France, **3** LabEx DEVweCAN, Lyon, France, **4** UNIV UMR1052, Lyon, France, **5** Université de Lyon, Lyon, France, **6** Centre Léon Bérard, Lyon, France, **7** ProfileXpert, Bron, France, **8** Institut Universitaire de France, Paris, France

## Abstract

By fostering cell commitment to the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), SNAIL proteins endow cells with motility, thereby favoring the metastatic spread of tumor cells. Whether the phenotypic change additionally facilitates tumor initiation has never been addressed. Here we demonstrate that when a SNAIL protein is ectopically produced in non-transformed mammary epithelial cells, the cells are protected from anoikis and proliferate under low-adherence conditions: a hallmark of cancer cells. The three SNAIL proteins show unequal oncogenic potential, strictly correlating with their ability to promote EMT. SNAIL3 especially behaves as a poor EMT-inducer comforting the concept that the transcription factor functionally diverges from its two related proteins.

**Citation:** Gras B, Jacquaroud L, Wierinckx A, Lamblot C, Fauvet F, et al. (2014) Snail Family Members Unequally Trigger EMT and Thereby Differ in Their Ability to Promote the Neoplastic Transformation of Mammary Epithelial Cells. PLoS ONE 9(3): e92254. doi:10.1371/journal.pone.0092254

**Editor:** Hidayatullah G. Munshi, Northwestern University, United States of America

**Received:** January 13, 2014; **Accepted:** February 19, 2014; **Published:** March 17, 2014

**Copyright:** © 2014 Gras et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was financially supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer and was performed within the framework of the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061 of Lyon University, within the program “Investissements d’Avenir (ANR-11-IDEX 0007) operated by the French National Agency (ANR). BG received support from the Ministère de la Recherche and the Fondation des Treilles. LJ is a recipient of fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** the authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: alain.puisieux@lyon.unicancer.fr; stephane.ansieau@lyon.unicancer.fr

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a latent embryonic process endowing cells with a transient migratory potential. This phenotypic switch is essential to the establishment and evolution of epithelial structures during both morphogenesis and organogenesis. Hijacking of this cell conversion mechanism has been identified as a driving force of cancer cell dissemination [1]. Since this seminal observation, a wide number of studies has confirmed that aberrant induction of master regulators of EMT, including mainly the members of the SNAIL, TWIST, and ZEB transcription-factor families, afford cancer cells motility and invasive properties [2]. While the link between EMT and metastasis is commonly accepted, a role for EMT in promoting tumor initiation has recently emerged. We and others have demonstrated that the TWIST and ZEB proteins override oncogene-induced senescence and apoptosis and cooperate with oncoproteins such as RAS and MYC to foster murine cell transformation both *in vitro* and *in vivo* [3–6]. Furthermore, we have demonstrated that combining a TWIST or ZEB protein with a single mitogenic oncoprotein is sufficient to promote immortalized human mammary epithelial cell (HMEC-hTERT) dedifferentiation and transformation [7].

The SNAIL transcription factors are generally considered as the gold standard EMT-inducers. In this regard, they play a central role in morphogenesis and were found as essential for mesoderm and neural crest delamination in several organisms from flies to mammals [8–16]. SNAIL1 (encoded by the *SNAIL* gene and previously called SNAIL) and SNAIL2 (encoded by the *SNAIL2* gene and previously called SLUG) were shown a decade ago to turn down *CDH1* transcription, leading to a loss of the epithelium gatekeeper E-cadherin, and thereby to promote EMT [17–19]. In support of this observation, reactivation of *SNAIL1* or *SNAIL2* has been associated with a high risk of metastasis and a poor prognosis in different tumor progression models [20–22], although an inverse correlation with E-cadherin expression is not always observed [23,24]. While SNAIL proteins are seen as potent EMT inducers associated with cancer cell dissemination, their role in tumor initiation has never been addressed. Yet detection of SNAIL1 in *in situ* ductal carcinoma, at a stage preceding cancer cell dissemination, suggests that SNAIL proteins, like the TWIST and ZEB proteins, have additional oncogenic properties [5,6]. In support of this view, moderate upregulation of *Snai1* or *Snai2*, as induced in CombitA-*Snai1* and CombitA-*Snai2* transgenic mice, is associated with spontaneous development of epithelial and/or mesenchymal tumors.

The SNAIL3 (encoded by the *SNAI3* gene and previously called SMUC) transcription factor is the last member of the family to be acknowledged, originally cloned by PCR from adult skeletal muscle with degenerative primers, before being identified through *in silico* analyses [25,26]. The protein shares with both SNAIL1 and SNAIL2 proteins a similar structural organization encompassing an N-terminal SNAG transrepression domain and a C-terminal DNA binding domain encompassing 4 to 5 zinc-fingers [26]. Expression analysis of *Snai3* expression by *in situ* hybridization during mouse embryonic development demonstrated that *Snai3* transcripts are specifically detected in skeletal muscle and thymus at a relatively late stage of mouse development [27] suggesting specific and EMT-unrelated functions of SNAIL3. In support of this conclusion, using a *Snai3*-EYFP transgenic mouse model, *Snai3* expression was confirmed to be constrained to skeletal muscle and thymus and not to EMT sites [28]. Furthermore, *Snai3* null mice do not exhibit any obvious phenotype including no evident defect in T lymphocyte development [28], while *SNAI3* transduction in hematopoietic stem cells was previously shown to favor their commitment into the myeloid lineage at the expense of the lymphoid lineage [29]. Lack of phenotype has recently been explained by demonstrating that SNAIL2 and SNAIL3 display redundant functions in regards to B and T cell differentiation. This functional redundancy is likely not restricted to lymphomagenesis, as *Snai2*<sup>-/-</sup> *Snai3*<sup>-/-</sup> double knockout mice elicit a more severe phenotype than single *Snai2*<sup>-/-</sup> knockout, namely a stunted growth phenotype, a paucity of offspring, in addition to the previously discussed inhibition of B and T cell development [30]. Collectively, this information suggests that the three SNAIL proteins are not functionally equivalent but rather behaves as overlapping modules. SNAIL1 and SNAIL2 proteins share similar EMT-promoting functions with a different predominance in mammals and birds [12,16,31] and SNAIL2 and SNAIL3 are both implicated in hematopoietic stem cell fate. In line with their expression profile during embryonic development, we herein demonstrate that, SNAIL3, unlike SNAIL1 and SNAIL2, actually behaves as an inefficient EMT-inducer in immortalized but non-transformed mammary epithelial cells. We next exploit this differential efficiency to further explore the link between the cell commitment into EMT and the acquisition of neoplastic transformation-associated properties.

## Results

### *SNAI3* is aberrantly reactivated in breast cancers

While the *SNAI1* and *SNAI2* genes are reported to be frequently reactivated in numerous carcinomas (breast, esophageal, colon, kidney) [32–35], the status of the related *SNAI3* gene has remained unclear. To address this question, *SNAI3* expression was assessed by qRT-PCR in a cohort of primary human tumors (n = 44) encompassing four different carcinoma types (colon, lung, ESCC, kidney), as compared to healthy tissues or normal cell counterparts. *SNAI3* transcription was barely detectable in colon and lung cancers and weakly induced in ESCC and kidney cancers (data not shown), but significantly induced in primary non-metastatic breast tumors from untreated patients, as compared to immortalized mammary epithelial cells (HMEC-hTERT) (FC > 10 in 58.2%, n = 67) (Figure 1). In these primary breast tumors, *SNAI1* transcription was also frequently induced (FC > 10 in 68.6%, n = 67) in line with previous reports [36–38]. We confirmed that the *SNAI2* gene is transcriptionally active in HMEC-hTERT cells (Figure 2E) [39], an expression that remained largely unaffected in primary tumors. Consistently with this observation, *SNAI1* is commonly induced in human breast carcinoma cell lines (FC > 10,

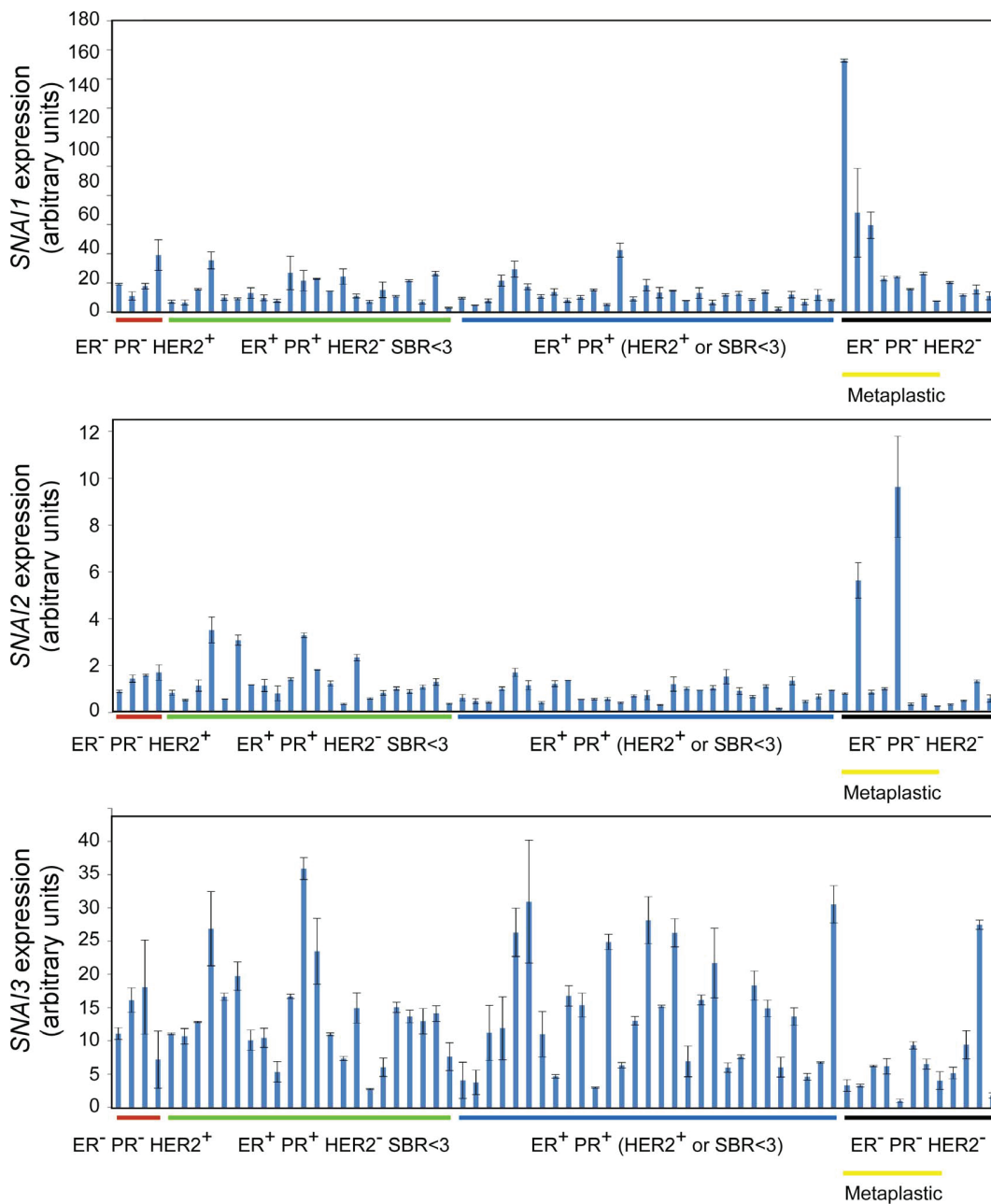
63.6%, n = 11) as compared to HMEC-hTERT cells. The *SNAI3* gene also appeared to be expressed in several human breast cancer cell lines, although the induction level was much lower (FC > 5 in 36.3%, n = 11), while *SNAI2* expression remained unchanged (Figure S1). *SNAI1* and *SNAI3* induction did not associate with a specific tumor subtype and were not correlated one to each other.

In conclusion, both *SNAI1* and *SNAI3* gene expressions are induced in primary breast tumors compared to normal mammary epithelial cells, suggesting that likewise SNAIL1, SNAIL3 may also contribute to breast tumorigenesis.

### SNAIL proteins promote EMT with unequal efficiency

In the light of its different expression profile during development [27], we reasoned that SNAIL3 might differ from SNAIL1 and SNAIL2 as regards EMT induction, a difference that might be exploited to evaluate the contribution of EMT to cell transformation. To explore this possibility, immortalized mammary epithelial cells (HMEC-hTERT) were infected with SNAIL-encoding retroviral constructs (the resulting cells are hereafter referred to as SNAIL-HMECs). N-terminal tagged versions of the proteins were firstly used. Nonetheless, the few additional residues were found to annihilate SNAIL protein function likely by interfering with the N-terminal SNAG transrepression domain (data not shown). We thus sought to compare the activities of untagged versions of the SNAIL proteins, despite the difficulty to confirm equal protein expression. Examination of cell morphology and assessment of epithelial markers (E-cadherin,  $\beta$ -catenin) and mesenchymal markers (N-cadherin, fibronectin, and vimentin) by immunofluorescence and western blotting (Figure 2A, B, F) demonstrated that all three proteins promoted cell commitment to EMT, but with varying efficiency. SNAIL1-HMECs underwent almost complete EMT. Although expressing a residual amount of E-cadherin, they displayed a fibroblastic morphology and invasive properties. By comparison, SNAIL2- and SNAIL3-HMECs were found to be only partially committed to the transdifferentiation program, as demonstrated by weakened cell-cell contacts and co-expression of epithelial and mesenchymal markers (Figure 2). Strikingly, SNAIL2- and SNAIL3-HMECs lacked invasive properties (Figure 2D). In line with the role of EMT in cell dedifferentiation [40,41], 71.0% of the SNAIL1-, 13.5% of the SNAIL2-, and 1.7% of the SNAIL3-HMECs displayed a stem-cell-like CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup> antigenic phenotype. To further strengthen our conclusions, gene expression profiles of the HMEC-derived cell lines were established. Comparison of these gene expression profiles with the recently established EMT-associated signature [42] confirmed the gradient of efficiency of the SNAIL proteins in promoting EMT (Table S1). Interestingly, while the expression of no less than 404 genes was found to respond - in similar fashion - to both SNAIL1 and SNAIL2, only 156 of them appeared to be modulated by SNAIL3 (Figure 2G). In keeping with a previous study [43], SNAIL1/2 production appeared associated with decreased expression of luminal differentiation markers and with activation of the TGF $\beta$  pathway. To rule out the possibility that the inefficiency of SNAIL3 to promote EMT results of protein instability, C-terminal tagged versions of SNAIL1 and SNAIL3 were generated. Despite a higher level of expression and a correct nuclear localization (Figure S2B–D), SNAIL3 still remained inefficient in promoting EMT in HMEC-hTERT cells, as judged by the cell morphology (Figure S2A) and the expression of epithelial and mesenchymal markers (Figure S2C, D). As EMT induction by SNAIL1 is mediated by the direct transcriptional repression of *CDH1* (the E-cadherin encoding gene), we next compared the efficiency of SNAIL1 and SNAIL3 to repress the transcriptional activity of the *CDH1* promoting





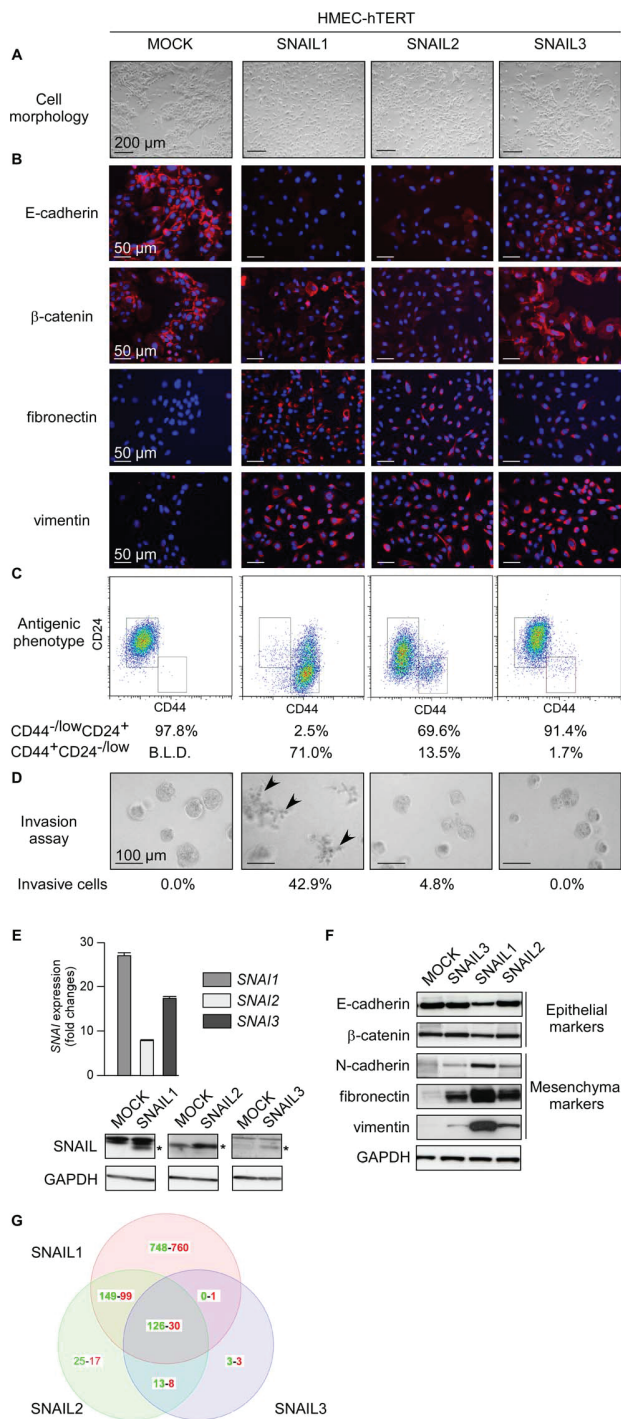
**Figure 1. Determination by RT-qPCR of *SNAI1*, *SNAI2* and *SNAI3* transcript levels in human primary mammary tumors.** Levels expressed relatively to housekeeping gene transcripts were normalized with respect to HMEC-hTERT cells. ER/PR: expression analysis of the estrogen and progesterone receptor, + means >10% expressing cells. HER2<sup>+/+</sup>: amplification status of the *ERBB2* gene. SBR: Scarff-Bloom-Richardson grade. Metaplastic tumors include malpighian and sarcomatoid carcinomas.  
doi:10.1371/journal.pone.0092254.g001

sequences, as assessed in a reporter assay [19]. While SNAIL1 as expected successfully annihilated reporter expression in an E-box integrity dependent manner, SNAIL3 failed to do so (Figure S2E). Collectively, these experiments demonstrated that EMT-induction is not the primary function of SNAIL3, as expected from its embryonic expression pattern [27].

The immortalized MCF10A breast cell line is more responsive to EMT-promoting cytokines than HMEC-hTERT cells, suggesting that active intracellular pathways/factors make them prone to commit into this transdifferentiation program (data not shown).

We thus evaluated whether SNAIL3 remained inefficient in inducing EMT in such a favorable cellular context or may cooperate with such pathways/factors to trigger EMT. The phenotypic switch was actually detectable with all three SNAIL proteins (Figure 3A, B, E). All MCF10A derivatives predominantly displayed a stem-cell-like antigenic phenotype (Figure 3C). Nonetheless, a gradient of EMT-promoting activity remained detectable (SNAIL1>SNAIL2>SNAIL3), as demonstrated by assessment of epithelial and mesenchymal markers (Figure 3F), gene expression profiles (Table S1), and cell invasive properties (Figure 3D).





**Figure 2. SNAIL proteins act with different potency to promote human mammary epithelial cell commitment into EMT.** HMECs were infected with the *SNAIL* retroviral constructs as indicated at the top. (A) Representative photomicrographs of cells obtained by phase contrast microscopy. (B) Analysis of epithelial markers (E-cadherin,  $\beta$ -catenin) and mesenchymal markers (fibronectin, vimentin) by immunofluorescence. (C) Analysis by flow cytometry of CD44 and CD24. Percentages of CD44<sup>low</sup>CD24<sup>+</sup> and CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup> cells are indicated. B.L.D.: below the limit of detection. (D) Invasion assay. Percentages of invasive cells are indicated. Invasive cells are arrowed. (E) Upper panel: Analysis of *SNAIL*-transgene expression by qRT-PCR in the corresponding transfected cell lines. Levels are expressed relatively to

the housekeeping gene *HPRT1*. Lower panels: western blot analysis of SNAIL proteins. Proteins of interest are indicated by stars. (F) Analysis of epithelial and mesenchymal markers by western blotting. (G) Venn diagram showing the overlap of genes upregulated (in red) or down-regulated (in green) in SNAIL-HMEC derivatives as compared to the parental HMEC-hTERT cell line and as determined with a 1.5-fold cut-off and a p value <0.1.

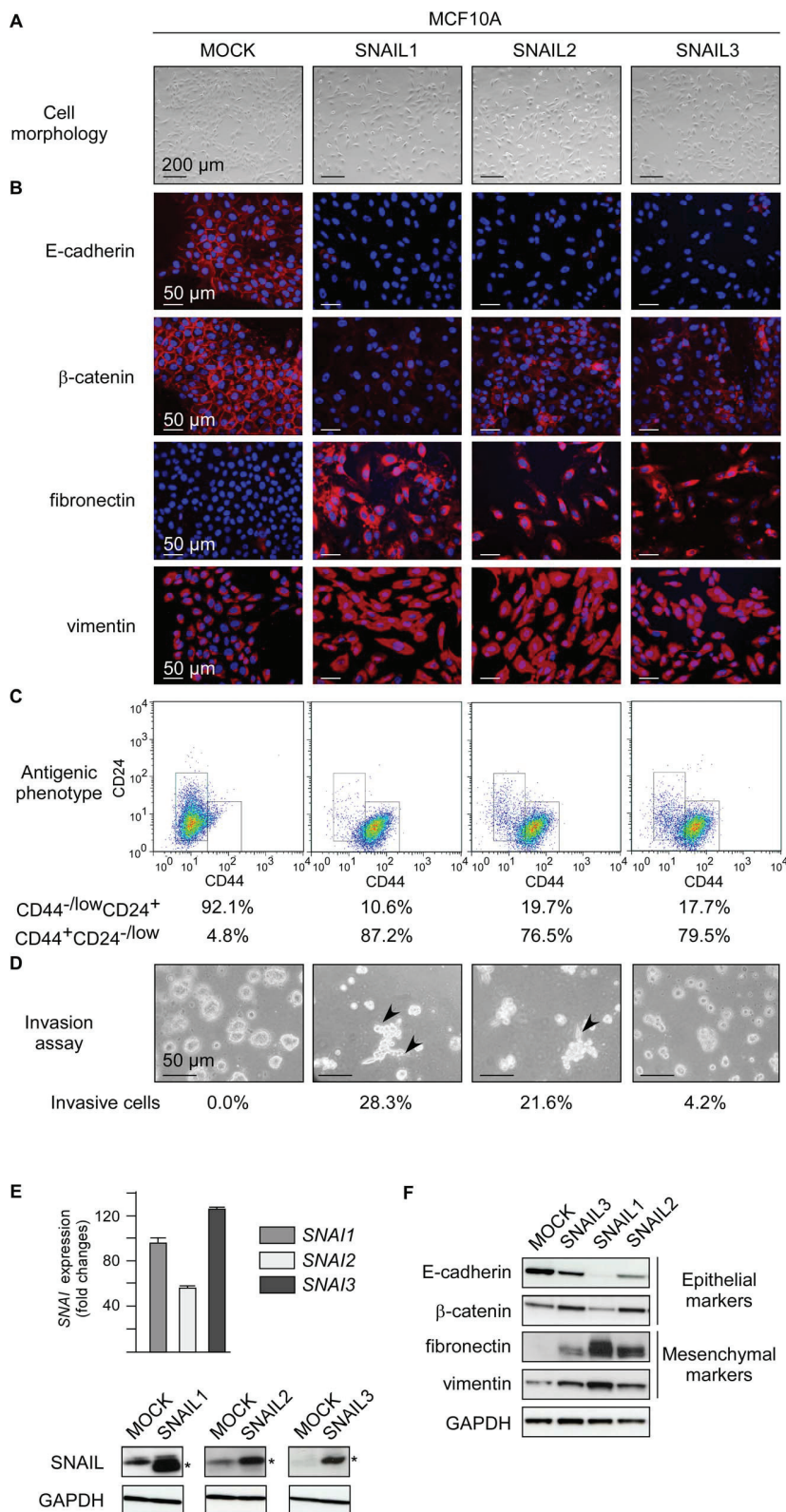
doi:10.1371/journal.pone.0092254.g002

Despite some inefficacy in triggering EMT on its own, SNAIL3 may thus take part in EMT-promoting interactomes [42,44] and thereby to some extent contribute to the cell reprogramming.

Ectopic expression of *SNAIL* mRNAs in HMEC-hTERT and MCF10A cells provided syngenic cell lines that only differ by their commitment rate in EMT. We thus sought to next take profit of these cellular models to explore the contribution of EMT in the acquisition of some malignant properties.

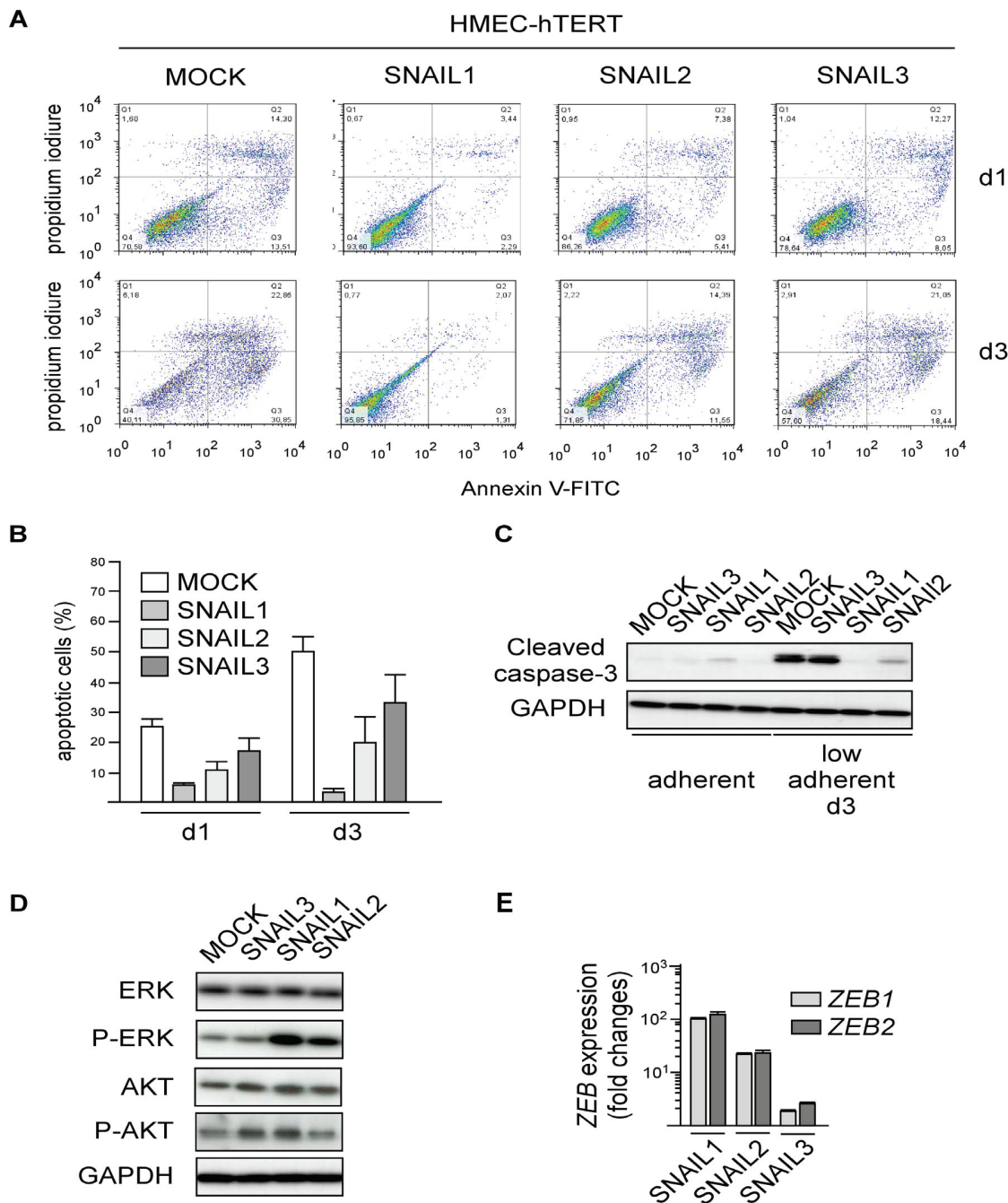
### SNAIL proteins can endow immortalized mammary epithelial cells with malignant properties

To invade the lumen ducts or colonize secondary sites, cancer cells have to survive detachment from the extracellular matrix, an event committing normal cells to a cell-death program known as anoikis. EMT, by down-regulating E-cadherin expression, is known to render cells resistant to anoikis [45,46]. We thus examined whether the extent to which a SNAIL protein promotes EMT might affect its ability to protect cells under stress. To this end, we cultured SNAIL-HMEC and SNAIL-MCF10A cells in ultra-low-attachment culture dishes for different periods of time and monitored cell death either by FITC-Annexin V/PI labeling or by measuring the level of activated caspase-3. As suspected, the three SNAIL proteins were indeed found to protect HMEC-hTERT cells from anoikis with different efficiency, and the degree of protection observed (SNAIL1>SNAIL2>SNAIL3, Figure 4A–C) paralleled their ability to promote EMT. It also paralleled their ability to activate pathways (AKT and MAPK) (Figure 4D) and downstream genes (*ZEB1/2*) (Figure 4E) reported to determine the capacity to survive detachment from the extracellular matrix [47,48]. In MCF10A cells, where all three SNAIL proteins successfully trigger EMT (Figure 3), they were found to protect the cells similarly from anoikis (Figure 5). As we previously demonstrated that EMT facilitates human mammary epithelial cell transformation [7], we next assess the SNAIL oncogenic potential by performing soft agar colony assays. SNAIL1 was found to stimulate potently the transformation of HMEC-hTERT cells. While SNAIL2 caused the appearance of a few colonies on agar, SNAIL3 showed practically no transforming potential (Figure 6A). Forced production of SNAIL proteins in MCF10A likewise triggered cell transformation with a gradient of efficiency mirroring the gradient of ability to trigger EMT (Figure 6B). Colonies were found to be larger when experiments were performed in MCF10A, suggesting that these cells display a proliferative advantage when cultured in such low-adherence conditions. As MCF10A display an amplification of *MYC* [49], we thus evaluated whether combining SNAIL proteins with c-MYC in HMEC-hTERT cells may similarly improve the colony growth. As shown in Figure 6C, adjoined expression of c-MYC affords cells a growth advantage demonstrating a synergistic effect of c-MYC and SNAIL proteins in promoting mammary epithelial cell transformation. Noticeably, the malignant transformation remained partial as cells remained devoid of a tumorigenic potential, when subcutaneously xenografted into *nude* mice (data not shown). The synergistic effects of c-MYC and SNAIL proteins also did not further engage cells into EMT, as demonstrated by the expression



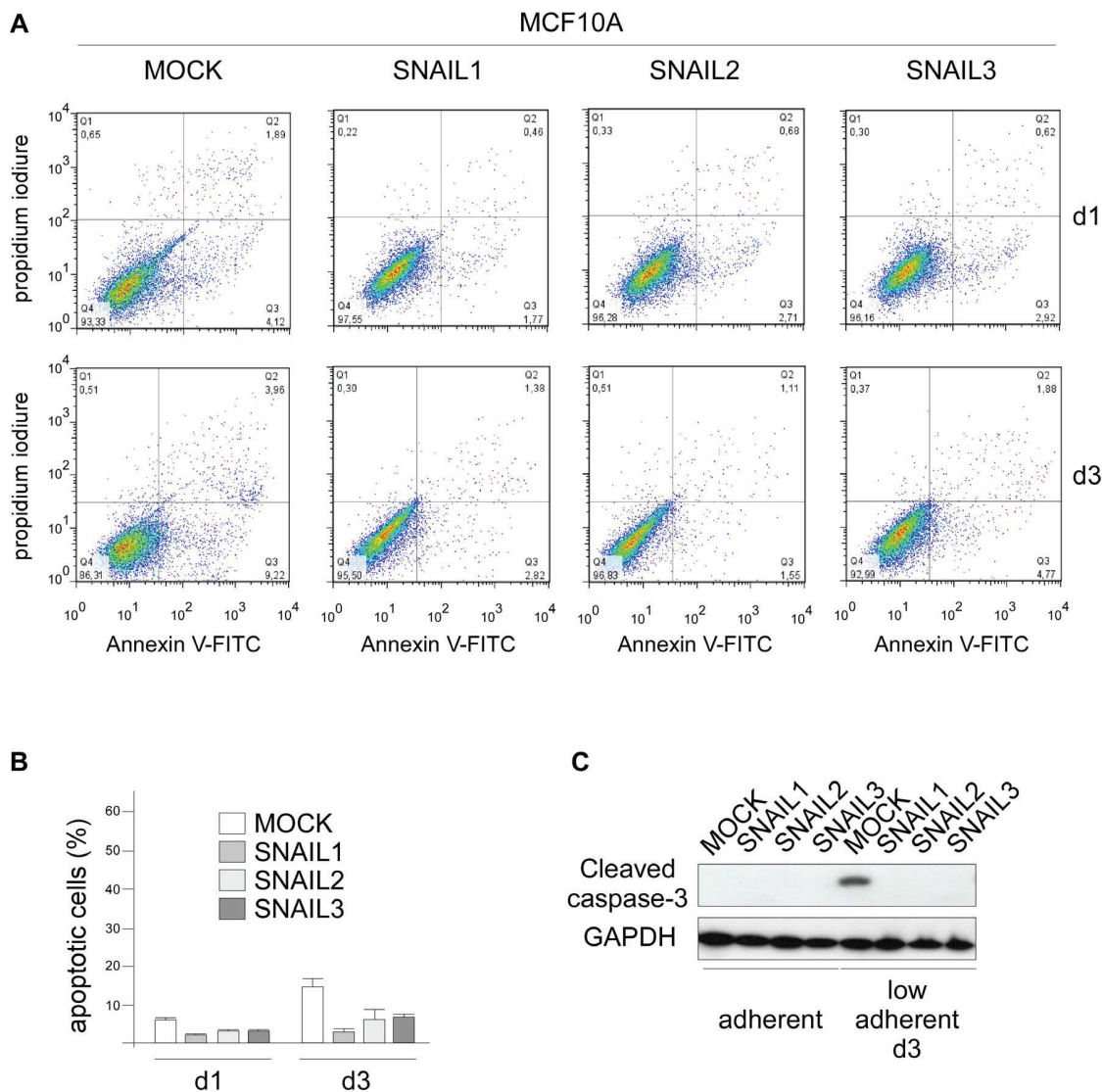
**Figure 3. SNAIL proteins promote MCF10A commitment to EMT.** MCF10A cells were infected with constructs encoding SNAIL proteins as indicated at the top and characterized. (A) Representative photomicrographs of cells obtained by phase contrast microscopy. (B) Analysis of epithelial (E-cadherin,  $\beta$ -catenin) and mesenchymal (fibronectin, vimentin) markers by immunofluorescence. (C) Analysis by flow cytometry of CD44 and CD24. (D) Invasion assay. Percentages of invasive cells are indicated. (E) Upper panels: analysis of ectopic *SNAIL* expression by qRT-PCR. Transcript levels are expressed with respect to transcripts of the *HPRT1* housekeeping gene. Lower panels: western blot analysis of SNAIL proteins. Proteins of interest are

indicated with stars. (F) Analysis of epithelial and mesenchymal markers by western blotting.  
doi:10.1371/journal.pone.0092254.g003



**Figure 4. SNAIL proteins confer a survival advantage to HMEC-hTERT cells under low-adherence conditions.** (A) Upper panels: HMEC-derived cell lines were cultured in ultra-low attachment dishes for different periods of time as indicated on the right. The cells were then stained with annexin V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. (B) Percentages of apoptotic cells (including Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> and Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> cells) are indicated as means  $\pm$ SD of triplicate experiments. (C) Analysis of the cleaved caspase-3 fragment by western blotting. (D) Examination by western blotting of the status of the ERK and AKT pathways. P-ERK and P-AKT stand for phospho-T202, Y204 ERK1/2 and phospho-S473 AKT respectively. (E) Expression analysis of *ZEB1* and *ZEB2* in HMEC-hTERT cells ectopically expressing either *SNAIL1*, *SNAIL2* or *SNAIL3*. Levels expressed relatively to the housekeeping *HPRT1* gene transcripts were normalized with respect to HMEC-hTERT cells  $\pm$ SD of triplicates.  
doi:10.1371/journal.pone.0092254.g004





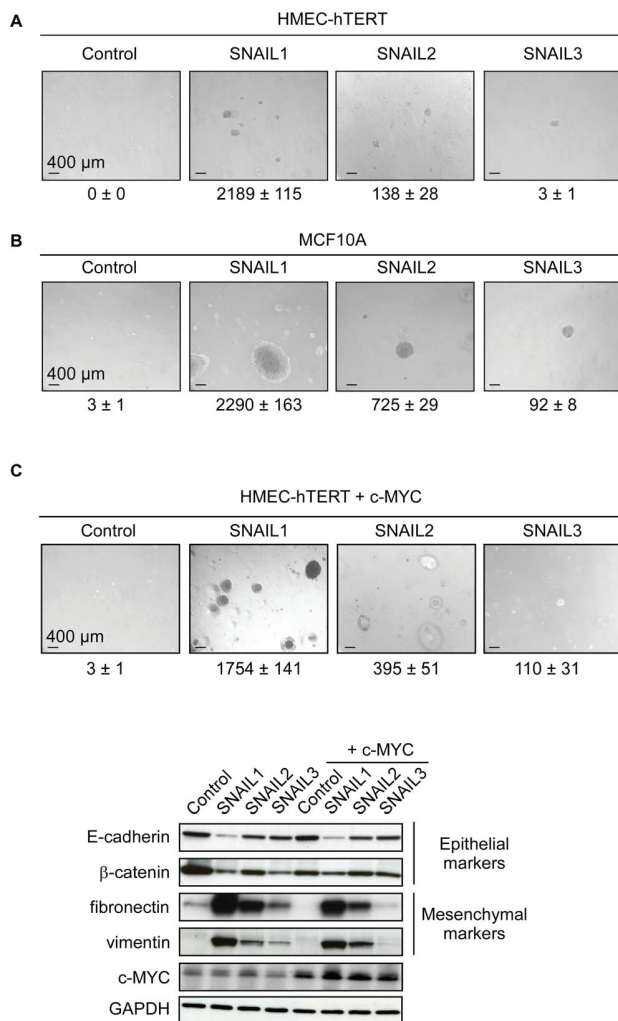
**Figure 5. SNAIL proteins confer a survival advantage to MCF10A cells under low-adherence conditions.** (A) MCF10A cells infected with SNAIL-protein-encoding constructs, as indicated at the top, were cultured in ultra-low attachment dishes for different periods of time as indicated on the right. Cells were then stained with annexin V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. The results shown are representative of three independent experiments. (B) Histogram showing percentages of apoptotic cells (including annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> and annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> cells) means with SD of triplicate experiments. (C) Analysis of cleaved caspase-3 fragment by western blotting.

analysis of epithelial and mesenchymal markers by western blotting (Figure 6C).

## Discussion

A growing body of evidence supports the view that EMT-inducing transcription factors play a dual role during tumor progression, promoting malignant conversion on the one hand and the metastatic cascade in the other [2]. While the pro-metastatic properties of SNAIL proteins are well documented, their potential contribution to tumor initiation has never been investigated. To address this issue, we have estimated the oncogenic potential of SNAIL proteins in immortalized human mammary epithelial cells. We have included in our analysis SNAIL3, whose gene shows aberrant expression in human primary breast tumors (Figure 1). Obviously, the lower level of *SNAIL3* transcript observed in breast

cancer cell lines than in tumors suggests that part of the signal observed in patient samples is attributable to the stromal compartment. We have unfortunately failed to address this hypothesis, as the commercially available anti-SNAIL3 antibody is not specific enough. It is worth noting that the SNAIL1 protein has been detected in both the epithelial and stromal compartments of breast ductal carcinomas [39]. By infecting non-transformed mammary epithelial cells with *SNAIL* retroviral expression constructs, we have highlighted a direct correlation between the ability of a protein to cause the cells to commit to EMT and its ability to promote cell survival and proliferation in the absence of adhesion, a feature of cancer cells [50]. SNAIL3 appears much less active than SNAIL1 and SNAIL2 in HMEC-hTERT cells (Figure 2). Reproducing experiments with C-terminal tagged versions of SNAIL1 and SNAIL3 confirmed that the differential activity of the two proteins relied on neither dissimilar protein stability nor on



**Figure 6. SNAIL proteins are sufficient to promote mammary epithelial cell transformation.** (A) HMECs were transfected with the SNAIL-protein-encoding construct as indicated at the top and their transformation potential was assessed in a soft-agar colony assay. Numbers of colonies are means of triplicate counts. (B) MCF10A cells were similarly transfected with SNAIL-encoding constructs and their transformation potential assessed in a soft-agar colony assay. Numbers of colonies are means of triplicate counts. (C) HMECs were sequentially transfected with the SNAIL and c-MYC protein-encoding construct as indicated at the top and their transformation potential was assessed in a soft-agar colony assay (upper panels). Numbers of colonies are means of triplicate counts. The analysis of epithelial and mesenchymal markers by western-blotting demonstrated that the exacerbated growth of colonies did not correlate with a further commitment into EMT (lower panels).

doi:10.1371/journal.pone.0092254.g006

inappropriate subcellular localization (Figure S2). At this stage, however, we cannot exclude the possibility that essential signals for SNAIL3 activity (post-translational modifications) might be absent in HMECs. As SNAIL3-MCF10A cells did commit to transdifferentiation, albeit incompletely (Figure 3), these requested activation steps may occur in that cellular context. Alternatively and more likely, EMT induction does not constitute the primary function of SNAIL3. In support of this conclusion, SNAIL3 is undetectable at EMT sites during embryonic development [27]. Nonetheless, SNAIL3 may take part in complex interactomes generated by

EMT-inducers and signaling pathways [42,44] and thereby contributes to some extent to EMT induction, as observed in MCF10A.

EMT-induction associates with a gain of some malignant properties. In line with previous reports, commitment into the transdifferentiation program affords cells a resistance to anoikis [45–47]. We herein demonstrate that SNAIL proteins, strictly correlating with their ability to promote EMT, additionally afford cells a proliferation advantage in low-adherent conditions. Based on their differential efficiency in promoting the malignant transformation of MCF10A and HMEC-hTERT, we next explored a potential cooperation with c-MYC and actually found that SNAIL proteins cooperate with the mitogenic oncoprotein in promoting colony formation in a soft-agar assay. This observation provides a rationale to the recent detection of the SNAIL1 protein in *in situ* ductal carcinoma, at a stage where tumors do not spread and further strengthens our recent demonstration of a role of EMT in facilitating the malignant transformation of epithelial cells [7].

## Materials and Methods

### Expression vectors

The cDNAs encoding human wild-type SNAIL1 (GenBank NM\_005985), SNAIL2 (GenBank NM\_003068), and SNAIL3 (GenBank NM\_178310) were generated by PCR and subcloned into the pBabe-Puro (Addgene) or pPRIP-Puro retroviral vector [51]. HA-tag was inserted in the C-terminus of SNAIL1 or SNAIL3 by PCR-mutagenesis. The c-MYC pBabe retroviral construct was generously provided by Martin Eilers (Würzburg University, Germany).

### Cell culture

Primary HMECs were provided by Lonza and immortalized by expression of the gene encoding the catalytic subunit of the telomerase hTERT. Derivatives were cultured in 1:1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/HAMF12 Glutamax medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Invitrogen), 0.5% penicillin-streptomycin (Invitrogen), 0.5% gentamycin (Invitrogen), 10 ng/ml human epidermal growth factor (EGF) (PromoCell), 0.5 mg/ml hydrocortisone (Sigma), and 10 mg/ml insulin (Actrapid). MCF10A cells were provided by the ATCC and cultured as described in [52]. Human cancer cell lines were provided by the ATCC and cultured according to the supplier's recommendations. Anoikis-resistance assays were performed by seeding  $2 \times 10^5$  cells into 6-well Ultra-Low Adherence dishes (Corning) for 1 or 3 days. The cells were then collected by centrifugation. Aggregates were dissociated by incubating the cells for 10 min with TrypLE Express at 37°C and the cells were used for further analysis.

### Retroviral infection

Retroviral particles were generated by PEI transfection of the amphotropic GP293 or the ecotrophic PlatE packaging cell line with the retroviral vector pBabe or pPRIP into according to the manufacturer's recommendations (Euromedex). Viral stocks were harvested two days post-transfection, filtered (pore size: 0.45  $\mu$ m), diluted 1:2 and placed in contact with cells for 10–12 h in the presence of 8  $\mu$ g/ml polybrene. Sequential infections were spaced by a 48 h period of time. Selection was initiated 24 h post-infection (or post-second infection) with 0.5  $\mu$ g/ml puromycin or 100  $\mu$ g/ml neomycin and continued for 7 days.

### Immunoblot analysis

Cells were washed twice with a PBS- 0.5% EGTA solution and lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP40, 100 mM Tris pH 7.5, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 1 mM EGTA) supplemented with complete protease (Roche) and phosphatase inhibitors (Sigma). After clarification by centrifugation at 14 000 rpm for 20 min at 4°C, cell extracts were subjected to SDS-PAGE. Proteins were revealed with mouse monoclonal anti-E-cadherin (clone 36, Becton Dickinson), anti- $\beta$ -catenin (clone 14, Becton Dickinson), anti-fibronectin (clone 10, Becton Dickinson), anti-vimentin (clone V9, Dako), anti-N-cadherin (Becton Dickinson), anti-phospho-ERK1/2 (9106S, Cell Signaling), anti-GAPDH (6C5, Biorad), rabbit monoclonal anti-active caspase 3 (ab32042, Abcam), or rabbit polyclonal anti-SNAIL1 (ab17732, Abcam), anti-SNAIL2 (G-18/SC-10436, Tebu-bio), anti-SNAIL3 (HPA016757, Sigma), anti-ERK1/2 (#9102, Cell Signaling), anti-AKT (8272, Cell Signaling), anti-phospho-AKT (Ser473) (#4058, Cell Signaling), anti-c-MYC A14 (sc-789, Santa Cruz Biotechnology), anti-HA Y11 (Santa-Cruz) and horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako). Antigen-antibody complexes were revealed with a reagent for western blotting (Santa Cruz).

### Analysis of SNAIL3 expression in human samples and cancer cells

Primary tumor samples were obtained through the Biological Resource Center of the Centre Léon Bérard with the agreement of the review board of the Centre Léon Bérard. Samples were used with the patient's written informed consent. The present study was approved by the review board of the Centre Léon Bérard.

RNA was extracted from tumors and cell lines (Figures 1 and S1) with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and its quality checked with the Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologie). cDNAs were produced from 100 ng RNA with the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Foster City, USA). Amplification was performed on a TaqMan Low Density Array (TLDA) with the Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem). *ACTB*, *HPRT1*, and *ARNT* were used as internal controls. List of assays ID: *SNAIL* Hs00195591\_m1; *SNAIL2* Hs00161904\_m1, *SNAIL3* Hs01018996\_m1, *ACTB* Hs99999903\_m1, *HPRT1* Hs01003267\_m1, *ARNT* Hs00234048\_m1.

### Gene expression analysis in established human cell lines

Total RNA (Figures 2, 3 and 4) was extracted with the RNeasy minikit (74106, Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed from 1  $\mu$ g total RNA with the Dynamo cDNA synthesis kit (F-470L, Thermo Scientific). The reverse transcription product was diluted 1:10 and used as cDNA template for qPCR analysis. SYBR green quantitative PCR was carried out in a CFX96 Real-time PCR detection system (Biorad). PCR mixtures contained SsoAdvanced SYBR Green supermix (1725264, Biorad) and 200 nM primers. The *HPRT1* housekeeping gene was used for normalization. Real-time PCR intron-spanning primers were designed with the Primer3 software. The following combinations of primers were used: *SNAIL* 5'-GCTGCAGGACTCTAATCCAGA-3' and 5'-ATCTCCGGAGGTGGGATG-3', *SNAIL2* 5'-TGGTTGCTTCAAGGACACAT-3' and 5'-GTTGCAGTGAGGGCAAGAA-3'; *SNAIL3* 5'-CCACAGGGTCCCCAACTAC-3' and 5'-GAGCAGGCACCATTGATTTTC-3'; *ZEI1* 5'-AACTGCTGGGAGGATGACAC-3' and 5'-TCCTGCTTCATCTGCCTGA-3', *ZEI2* 5'-AAGCCAGGGACAGATCAGC-3' and 5'-GCCACACTCTGTGCATTTGA-3', *HPRT1* 5'-TGACCTTGATT-

TATTTTGCATACC-3' and 5'-CGAGCAAGACGTT-CAGTCCT-3'.

### Microarray analysis

Microarray processing and data analysis were performed at the ProfileXpert core facility (Lyon, France). Gene expression profiles were analyzed with a whole human genome microarray containing 47231 probes (HumanHT-12 v4 Expression BeadChip; Illumina Inc., USA). Total RNA (500 ng) was amplified and biotin-labeled with the Illumina TotalPrep<sup>TM</sup> RNA Amplification Kit (Ambion Inc., USA). Hybridization was performed with 750 ng biotin-labeled cRNA on each BeadChip. The standard Illumina scanning protocol was used to scan the arrays with the iScan (Illumina Inc., USA). Data were normalized by quantile normalization with Genome Studio Software 2010 (Illumina Inc., USA). The complete set of raw and normalized files is available at the GEO database under accession number GSE40690. Data were analyzed with tools in Partek Genomic Suite 6.6 software (Partek Inc., St. Louis, MO). One-way ANOVA was performed to compare the different groups with controls. Gene lists were filtered with a fold-change cutoff of 1.5 and  $p < 0.1$ . We used the Venn diagram to visualize relationships between the created gene lists.

### Antigenic profile analysis

Cells detached with TrypLE-Express (12605-010, Invitrogen) were counted and then incubated in blocking solution (PBS containing 0.5% BSA (Sigma)) at 4°C for 30 min. Cell distributions were determined with FITC-CD44 G44-26 (BD Pharmingen), and PE-CD24 ML5 (BD Pharmingen) monoclonal antibodies and the FACScan Calibur (Becton Dickinson) and analyzed with the FlowJo software.

### Annexin/PI analysis

Cells collected by centrifugation were counted and then incubated with annexin V-FITC in binding buffer 1X (10 mM HEPES/NaOH pH 7, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) for 10 min in the dark according to the manufacturer's protocol (Abcyss). DNA staining was then performed with propidium iodide (0.6  $\mu$ g/ml) for 10 min. For each condition,  $10^4$  events were recorded by FACS (FACScan Calibur, Beckman Dickinson) and results were analyzed with the FlowJo software.

### Immunofluorescence

$10^4$  cells were seeded onto an 8-well Lab-TekII chamber slide, fixed in 3.7% formaldehyde solution (Sigma), and permeabilized in 0.1% Triton 100X (Sigma), PBS buffer at room temperature for 10 min. The cells were then washed 3 times with PBS and incubated for 1 h with 10% horse serum in PBS blocking solution. The cells were incubated overnight at 4°C with murine monoclonal anti-E-cadherin clone 36, (Becton Dickinson), anti- $\beta$ -catenin clone 14 (Becton Dickinson), anti-fibronectin clone 10 (Becton Dickinson), anti-vimentin clone V9 (Dako), or with a polyclonal rabbit anti-HA Y11 (Santa-Cruz) primary antibody, washed in PBS, and then incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-mouse Alexa Fluor 533 secondary antibody (A21422, Invitrogen) or with a mouse anti-rabbit Alexa Fluor 555 secondary antibody (A21428, Invitrogen). After extensive washes in PBS, the nuclei were stained with 5 mg/ml Hoechst for 10 min and mounted with Fluoromount-G (SouthernBiotech). All matched samples were photographed with an immunofluorescence microscope (Leica) and identical exposure times.



### Invasion assay

Invasion assay consisted in culturing  $5 \times 10^3$  cells/well in 2% Matrigel (BD Biosciences) on top of a 100% matrigel layer. Cells were photographed 5 days after seeding. Percentages of invasive cells were defined from more than 400 cell structures. Experiments were performed in duplicate.

### Soft-agar colony assay

To measure anchorage-independent growth, cells were detached with TrypLE-Express and resuspended in growth medium. 6-well plates were prepared with a coating of 0.75% low-melting temperature agarose (50100, Lonza) in complete growth medium and then overlaid with a suspension of cells in 0.45% low-melting agarose ( $5 \times 10^4$  cells/well). Plates were incubated for 2–3 weeks at 37°C in a humid CO<sub>2</sub> incubator and colonies were counted under the microscope. Experiments were performed in triplicate.

### Reporter assay

HMEC cells were transfected with 1.2 µg of SNAIL, 0.3 and 0.5 µg of firefly and renilla luciferase reporter constructs using GeneJuice as a transfection reagent (Merck Millipore). 48 h post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). To assess *CDH1* promoter activity, we used luciferase reporter vectors containing either a wild-type *CDH1* promoter fragment (−178, +92 bp) (*CDH1* wt), or the same fragment with mutated E-boxes (*CDH1* mut) [19]. Experiments were performed twice.

### Supporting Information

**Figure S1 Determination by RT-qPCR of *SNAIL*, *SNAIL2* and *SNAIL3* transcript levels in human mammary cancer cell lines.** Levels expressed relatively to housekeeping gene transcripts were normalized with respect to HMEC-hTERT cells. (PDF)

**Figure S2 Inefficiency of SNAIL3 in triggering EMT does not rely on protein instability or aberrant subcellular localization.** HMEC cells were infected with constructs encoding C-terminal tagged SNAIL1 or SNAIL3 proteins. (A) Representative photomicrographs of cells obtained by phase

contrast microscopy. Note that only *SNAIL* expressing cells underwent an EMT. (B and C) Analysis of SNAIL proteins (anti-HA antibody) and E-cadherin by immunofluorescence. (D) Analysis of epithelial and mesenchymal markers, and of SNAIL proteins by western-blotting. Please note the higher level of SNAIL3 protein. (E) Comparison of the ability of SNAIL1 and SNAIL3 transcription factors to down-modulate the transcriptional activity of a *CDH1*-reporter construct (*CDH1* wt). A reporter harboring mutations in E-boxes was used as a control (*CDH1* mut). Activities normalized with respect to basal reporter activity are indicated  $\pm$ SD of triplicates.

(PDF)

**Table S1 Expression of EMT-associated genes in SNAIL-HMEC and SNAIL-MCF10A cells.** Expression profiling of genes regulated during EMT transdifferentiation in HMEC-hTERT and MCF10A cells infected with SNAIL1-, SNAIL2-, or SNAIL3- encoding retroviral vectors. Firstly, transcripts of genes reported as downregulated during EMT [42]. Genes downregulated with a fold change (FC) between 1.5 and 3 are labeled in light green; those downregulated with FC>3 are labeled in dark green. Secondly, transcripts of genes reported as induced during EMT [42]. Genes upregulated with  $1.5 < \text{FC} < 3$  are labeled in orange; genes upregulated with FC>3 are labeled in red. (PDF)

### Acknowledgments

We are thankful to the Centre de Ressources Biologiques of the Centre Léon Bérard for providing the cohort of human breast tumor samples, to Martin Eilers (Würzburg University, Germany) for providing the c-MYC expression vector. We are thankful to Julie Pourchet, Guillaume Collin, Fabienne Barbet, Marjorie Carrere, Delphine Demangel, Audrey Pierrot, Mojgan Devouassoux-Shisheboran, Jérémy Bastid and Claire Ciancia for their technical help, and Dr Kathleen Broman and Louise Hill for critical reading of the manuscript.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BG LJ AP SA. Performed the experiments: BG LJ AW CL FF. Analyzed the data: BG LJ AP SA. Wrote the paper: SA. Provided technical support: JL.

### References

- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, et al. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927–939.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871–890.
- Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, et al. (1999) Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 13: 2207–2217.
- Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, et al. (2004) Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 6: 625–630.
- Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, et al. (2008) Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14: 79–89.
- Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS, Michaylira CZ, Grugan KD, et al. (2010) Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res* 70: 4174–4184.
- Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, et al. (2012) EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 8: e1002723.
- Alberga A, Boulay JL, Kempe E, Dennefeld C, Haenlin M (1991) The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111: 983–992.
- Nieto MA, Bennett MF, Sargent MG, Wilkinson DG (1992) Cloning and developmental expression of Sna, a murine homologue of the *Drosophila* snail gene. *Development* 116: 227–237.
- Smith DE, Franco del AF, Gridley T (1992) Isolation of Sna, a mouse gene homologous to the *Drosophila* genes snail and escargot: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development. *Development* 116: 1033–1039.
- Hammerschmidt M, Nusslein-Volhard C (1993) The expression of a zebrafish gene homologous to *Drosophila* snail suggests a conserved function in invertebrate and vertebrate gastrulation. *Development* 119: 1107–1118.
- Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J (1994) Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264: 835–839.
- Langeland JA, Tomsa JM, Jackman WR, Jr., Kimmel CB (1998) An amphioxus snail gene: expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo. *Dev Genes Evol* 208: 569–577.
- Wada S, Saiga H (1999) Cloning and embryonic expression of Hrsna, a snail family gene of the ascidian *Halocynthia roretzi*: implication in the origins of mechanisms for mesoderm specification and body axis formation in chordates. *Dev Growth Differ* 41: 9–18.
- Mayor R, Guerrero I, Young RM, Gomez-Skarmeta JL, Cuellar C (2000) A novel function for the Xslug gene: control of dorsal mesoderm development by repressing BMP-4. *Mech Dev* 97: 47–56.
- Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T (2001) The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21: 8184–8188.

17. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, et al. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76–83.
18. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, et al. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2: 84–89.
19. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, et al. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116: 499–511.
20. Shih JY, Tsai MF, Chang TH, Chang YL, Yuan A, et al. (2005) Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 8070–8078.
21. Shin NR, Jeong EH, Choi CI, Moon HJ, Kwon CH, et al. (2012) Overexpression of Snail is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *BMC Cancer* 12: 521.
22. Kobayashi M, Huang CL, Sonobe M, Kikuchi R, Ishikawa M, et al. (2013) Snail expression is associated with a poor prognosis in malignant pleural mesotheliomas. *Ann Thorac Surg* 95: 1181–1188.
23. Natsugoe S, Uchikado Y, Okumura H, Matsumoto M, Setoyama T, et al. (2007) Snail plays a key role in E-cadherin-preserved esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 17: 517–523.
24. Cates JM, Byrd RH, Fohn LE, Tatsas AD, Washington MK, et al. (2009) Epithelial-mesenchymal transition markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 38: e1–e6.
25. Kataoka H, Murayama T, Yokode M, Mori S, Sano H, et al. (2000) A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res* 28: 626–633.
26. Katoh M, Katoh M (2003) Identification and characterization of human SNAI3 (SNAI3) gene in silico. *Int J Mol Med* 11: 383–388.
27. Zhuge X, Kataoka H, Tanaka M, Murayama T, Kawamoto T, et al. (2005) Expression of the novel Snai-related zinc-finger transcription factor gene Smuc during mouse development. *Int J Mol Med* 15: 945–948.
28. Bradley CK, Norton CR, Chen Y, Han X, Booth CJ, et al. (2013) The snail family gene snai3 is not essential for embryogenesis in mice. *PLoS ONE* 8: e65344.
29. Dahlem T, Cho S, Spangrude GJ, Weis JJ, Weis JH (2012) Overexpression of Snai3 suppresses lymphoid- and enhances myeloid-cell differentiation. *Eur J Immunol* 42: 1038–1043.
30. Pioli PD, Dahlem TJ, Weis JJ, Weis JH (2013) Deletion of Snai2 and Snai3 results in impaired physical development compounded by lymphocyte deficiency. *PLoS ONE* 8: e69216.
31. Jiang R, Lan Y, Norton CR, Sundberg JP, Gridley T (1998) The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol* 198: 277–285.
32. Come C, Arnoux V, Bibeau F, Savagner P (2004) Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9: 183–193.
33. Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, et al. (2005) Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 1174–1180.
34. Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7: 415–428.
35. Ansieau S, Hinkal G, Thomas C, Bastid J, Puisieux A (2008) Early origin of cancer metastases: dissemination and evolution of premalignant cells. *Cell Cycle* 7: 3659–3663.
36. Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, et al. (2001) Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 20: 3814–3823.
37. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, et al. (2002) Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21: 3241–3246.
38. Geradts J, de Herrerros AG, Su Z, Burchette J, Broadwater G, et al. (2011) Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas. *Hum Pathol* 42: 1125–1131.
39. Come C, Magnino F, Bibeau F, De Santa BP, Becker KF, et al. (2006) Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 12: 5395–5402.
40. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, et al. (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* 3: e2888.
41. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–715.
42. Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, et al. (2010) Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15449–15454.
43. Dhasarathy A, Phadke D, Mav D, Shah RR, Wade PA (2011) The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer. *PLoS ONE* 6: e26514.
44. Hugo HJ, Kokkinos MI, Blick T, Ackland ML, Thompson EW, et al. (2011) Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. *Cells Tissues Organs* 193: 23–40.
45. Derksen PW, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, et al. (2006) Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* 10: 437–449.
46. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, et al. (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 68: 3645–3654.
47. Smit MA, Geiger TR, Song JY, Gitelman I, Peepers DS (2009) A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Mol Cell Biol* 29: 3722–3737.
48. Shin S, Dimitri CA, Yoon SO, Dowdle W, Blenis J (2010) ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol Cell* 38: 114–127.
49. Worsham MJ, Pals G, Schouten JP, Miller F, Tiwari N, et al. (2006) High-resolution mapping of molecular events associated with immortalization, transformation, and progression to breast cancer in the MCF10 model. *Breast Cancer Res Treat* 96: 177–186.
50. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.
51. Albagli-Curiel O, Lecluse Y, Pognonec P, Boulukos KE, Martin P (2007) A new generation of pPRIG-based retroviral vectors. *BMC Biotechnol* 7: 85.
52. Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, Brugge JS (2002) The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* 111: 29–40.



## **II. Correspondances en Onco-théranostic.**

### **La transition épithélio-mésenchymateuse : de la plasticité à la chimiorésistance**

La transition épithélio-mésenchymateuse est un mécanisme de transdifférenciation transitoire et réversible permettant de convertir des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. La réactivation aberrante de ce programme embryonnaire favorise l'initiation tumorale et promeut la dissémination métastatique. La présence de marqueurs de l'EMT chez le patient est un indicateur de mauvais pronostic. De plus, de récentes données établissent une forte corrélation entre la plasticité octroyée par l'EMT et l'acquisition de propriétés de chimiorésistance. En effet, l'activation des voies de signalisation impliquées dans l'EMT ou l'induction aberrante de facteurs de transcription embryonnaires situés en aval octroient aux cellules une chimiorésistance accrue. Inversement, leur inhibition permet une restauration de la sensibilité envers différentes drogues. Même si ces études établissent une corrélation forte entre la l'EMT et la résistance aux médicaments, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents reste nécessaire.

# La transition épithélio-mésenchymateuse : de la plasticité à la chimiorésistance

*Epithelial-mesenchymal transition: from plasticity to chemoresistance*

Laurent Jacqueroud\*, Stéphane Ansieau\*

RÉSUMÉ

» La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un mécanisme de transdifférenciation transitoire et réversible permettant de convertir des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. La réactivation aberrante de ce programme embryonnaire favorise l'initiation tumorale et promeut la dissémination métastatique. La présence de marqueurs de la TEM chez le patient est un indicateur de mauvais pronostic. De plus, de récentes données établissent une forte corrélation entre la plasticité octroyée par la TEM et l'acquisition de propriétés de chimiorésistance. En effet, l'activation des voies de signalisation impliquées dans la TEM ou l'induction aberrante de facteurs de transcription embryonnaires situés en aval octroient aux cellules une chimiorésistance accrue. Inversement, leur inhibition permet une restauration de la sensibilité envers différentes drogues. Même si ces études établissent une corrélation forte entre la TEM et la résistance aux médicaments, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents reste nécessaire.

» Dans cette revue, nous décrivons comment la TEM contribue à l'acquisition de ces mécanismes de résistance et discutons diverses stratégies susceptibles de surmonter ces effets.

**Mots-clés :** TEM – Plasticité – Adaptabilité – Chimiorésistance – Stratégies thérapeutiques.

SUMMARY

*Epithelio-mesenchymal transition (EMT) is a transient and reversible transdifferentiation process turning epithelial cells into mesenchymal ones. The hijack of this embryonic program facilitates tumor initiation as well as the metastatic spread of cancer cells. Detection of EMT-associated markers is often an indicator of poor prognosis and emerging evidence suggests a strong association between the EMT-associated plasticity and chemoresistance. Actually, activation of pathways involved in EMT signaling or aberrant induction of downstream embryonic transcription factors have been shown to afford cells chemoresistance. Conversely their depletion turned out to increase drug sensitivity. Even though these studies establish a strong correlation between EMT and drug resistance, a clear understanding of the underlying molecular mechanisms is still needed.*

*In this review, we describe how EMT may be involved in these resistance mechanisms and discuss potential strategies to overcome these effects.*

**Keywords:** EMT – Plasticity – Adaptability – Chemoresistance – Therapeutic strategies.

Comme largement discuté dans les autres articles de ce dossier thématique, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) constitue un mécanisme de conversion cellulaire indispensable à la morphogenèse et l'organogenèse au cours du développement embryonnaire (1). La comparaison des mécanismes de régulation de la TEM (ou plutôt des TEM) physiologique ou pathologique montre que l'activation aberrante de ce processus est davantage le résultat de la dérégulation des voies de signalisation que l'émergence de voies nouvellement induites. La réactivation aberrante de ce programme embryonnaire au cours de la tumorigenèse a été très largement associée à la dissémination métastatique et, plus récemment, à la transformation néoplasique (cf. article de A. Puisieux et J. Caramel, p. 126). Les étapes de la dissémination mé-  
tastatique impliquant la TEM sont multiples et concernent l'invasion des tissus adjacents, l'intravasation, la survie dans les flux et l'extravasation (1). Seule l'étape de colonisation semble davantage requérir le retour à un phénotype épithélial (2, 3). Le potentiel métastatique d'une cellule cancéreuse dépend donc vraisemblablement de sa plasticité et de sa capacité à transiter d'un phénotype à l'autre. Il nécessite par ailleurs que les cellules disséminées soient capables de se protéger de multiples stress. En effet, la perte de contacts intercellulaires et d'adhésion à la matrice extracellulaire conduit normalement à l'élimination des cellules par apoptose ou anoïkie (4). Le maintien des cellules tumorales dans ces conditions hostiles requiert donc la modulation de différentes voies de survie ainsi qu'une adaptation de leur métabolisme afin de supporter l'ensemble des

tastatique impliquant la TEM sont multiples et concernent l'invasion des tissus adjacents, l'intravasation, la survie dans les flux et l'extravasation (1). Seule l'étape de colonisation semble davantage requérir le retour à un phénotype épithélial (2, 3). Le potentiel métastatique d'une cellule cancéreuse dépend donc vraisemblablement de sa plasticité et de sa capacité à transiter d'un phénotype à l'autre. Il nécessite par ailleurs que les cellules disséminées soient capables de se protéger de multiples stress. En effet, la perte de contacts intercellulaires et d'adhésion à la matrice extracellulaire conduit normalement à l'élimination des cellules par apoptose ou anoïkie (4). Le maintien des cellules tumorales dans ces conditions hostiles requiert donc la modulation de différentes voies de survie ainsi qu'une adaptation de leur métabolisme afin de supporter l'ensemble des

\* Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Inserm UMR 1052, CNRS UMR 5286, centre Léon-Bérard, université Claude-Bernard - Lyon-I; LabEX DEVweCAN, Lyon.

stress associés au processus tumoral (5). Par ailleurs, ces cellules sont capables de neutraliser, voire de détourner, le système immunitaire afin de soutenir la croissance tumorale. Ces changements phénotypiques et fonctionnels sont vraisemblablement la résultante de profondes modifications épigénétiques, impliquant notamment une évolution des profils de méthylation et d'acétylation ou encore d'expression de micro-ARN, conduisant au remaniement complet des profils d'expression génique. Prises dans leur ensemble, ces données démontrent **une importante capacité des cellules en TEM à s'affranchir des mécanismes de sauvegarde, à moduler leur profil d'expression génique, rendant compte de leur adaptabilité, ce qui en fait des cellules multirésistantes capables d'échapper à de nombreuses thérapies.**

## TEM et chimiorésistance

Ces dernières années, de gros efforts ont été faits afin de comprendre les mécanismes de chimiorésistance. Une des approches utilisées a été d'établir des profils d'expression génique à partir d'un pool de lignées tumorales issues de divers tissus. Ces profils étaient corrélés à la sensibilité aux drogues couramment utilisées pour traiter les tumeurs associées à ces lignées. L'analyse de profils provenant de cancers du sein ou de l'ovaire, par exemple, a ainsi permis de corréler la chimiorésistance des tumeurs à une signature génique contenant de nombreux marqueurs de la TEM (6). À partir de là, il était légitime d'envisager la TEM comme un mécanisme moléculaire et cellulaire favorisant l'acquisition d'un phénotype de résistance, d'autant plus que, aux niveaux physiologique et pathologique, il a été démontré que différents facteurs de transcription embryonnaires induisant une TEM (FT-TEM) sont capables de neutraliser les systèmes de sauvegarde cellulaire (*cf. article de A. Puisieux et J. Caramel, p. 126*). Ils apparaissent comme des régulateurs majeurs des voies oncosuppressives dépendantes des protéines p53 et Rb, et ont un effet tant sur leur activation et leur stabilisation que sur leur activité transcriptionnelle. Il a également été démontré qu'ils étaient capables d'activer des voies de survie (AKT et NF- $\kappa$ B) et de moduler l'expression ou l'activité des membres de la famille Bcl-2 en faveur des protéines antiapoptotiques (7). En cela, les FT-TEM sont impliqués dans la résistance à diverses classes de molécules génotoxiques telles que les anthracyclines, les poisons du fuseau mitotique ou encore les dérivés du platine. Au-delà de ces molécules classiques, de nouvelles classes de médicaments, telles que les inhibiteurs de tyrosine kinases, ciblant spécifiquement certaines voies

moléculaires impliquées dans la progression tumorale, ont été développées. Cependant, très rapidement, plusieurs travaux ont mis en exergue l'apparition de résistances imputables à la TEM (8). Dès lors, l'expression des FT-TEM et l'engagement des cellules dans un programme de TEM ont été recherchés dans divers cas de chimiorésistance. Ainsi, loin d'être marginale, la TEM semble impliquée dans la résistance à une grande majorité des molécules classiquement utilisées en thérapie. Ces phénomènes de résistance ne se limitent pas à un tissu donné mais sont retrouvés dans des organes et tissus variés tels que le sein, la prostate, le rein, le poumon ou encore l'ensemble du tractus digestif.

Parallèlement aux études traitant de la perte de sensibilité aux drogues en lien avec la TEM, des travaux attestent également de l'induction de ce programme embryonnaire lors de l'exposition chronique de lignées de carcinomes colorectaux, notamment à de faibles doses de molécules thérapeutiques, telles que l'oxaliplatine (9). Les doses auxquelles apparaissent les marqueurs de TEM sont très proches des concentrations thérapeutiques, soulignant l'intérêt potentiel que pourraient représenter ces marqueurs en tant qu'éléments diagnostiques de résistance et de récurrence.

Un nouveau champ d'investigation s'est récemment ouvert avec l'implication des micro-ARN dans la régulation de la TEM (miR-200, miR-448, miR-Let7c) et de l'oncogenèse de manière générale. Différentes études menées sur des lignées tumorales mais aussi des échantillons tumoraux de patients ont montré une perte d'expression de ces divers micro-ARN après traitement par des molécules telles que les taxanes, le 5-FU et le cyclophosphamide (10, 11). En cela, ces résultats démontrent non seulement l'implication des micro-ARN dans l'induction d'une TEM mais également leur implication dans une probable baisse, voire une perte, de sensibilité des tumeurs à plusieurs molécules thérapeutiques.

Pris dans leur ensemble, ces travaux établissent **une forte corrélation entre l'induction d'une TEM et l'échappement thérapeutique.** Cependant, la compréhension des mécanismes moléculaires fait défaut dans la majorité des cas. Interviennent certainement l'inhibition des systèmes de sauvegarde et l'activation de signaux de survie, comme nous avons pu le voir précédemment. La présence de résistances croisées semble cependant suggérer que l'échappement thérapeutique ne résulte pas simplement de l'activation d'une voie de signalisation donnée. Sans répondre à toutes les interrogations, l'induction de mécanismes d'éluion des molécules thérapeutiques pourrait expliquer en grande partie cette universalité en termes de résistance. En effet, les cellules

humaines possèdent des protéines transmembranaires capables d'éluer différents substrats endogènes (protéines, ions, toxines, etc.) du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Au-delà de leur rôle primordial dans la physiologie humaine, bon nombre de ces transporteurs (de la famille ABC, PgP) se trouvent être surexprimés par les cellules tumorales et sont corrélés à une plus grande probabilité d'échec du traitement (12). De plus, l'expression de ces transporteurs est augmentée en réponse au traitement, suggérant un mécanisme hautement adaptatif (13). C'est donc logiquement que plusieurs laboratoires se sont tournés vers l'étude d'une possible induction de l'expression de ces transporteurs au cours de la TEM. Leurs résultats démontrent que **l'induction d'une TEM conduit à un gain d'expression de divers transporteurs de la famille ABC** (14). L'inhibition de ces facteurs, au niveau endogène, par interférence ARN dans des lignées tumorales mésenchymateuses, conduit non seulement à une réversion de la TEM mais aussi à une baisse significative de l'expression des pompes à efflux, s'accompagnant d'un gain important en termes de chimiosensibilité.

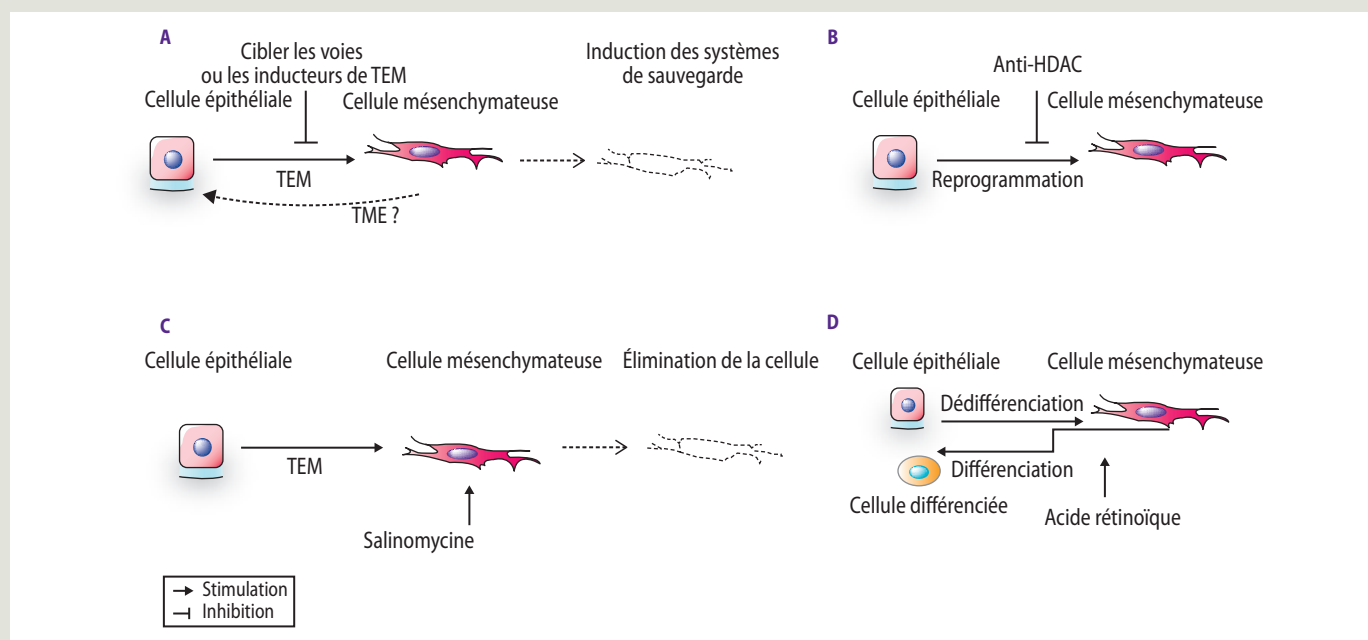
Au-delà des pompes à efflux, il existe de nombreux mécanismes pouvant réguler la biodisponibilité d'un médicament. La modification d'un certain nombre de processus métaboliques par les cellules tumorales peut conduire à l'altération des effets thérapeutiques d'un traitement. Le remodelage du pool enzymatique peut ainsi conduire à une altération de l'activation des prodrogues. C'est notamment le cas de l'irinotécan. Le clivage de cette prodrogue de la camptothécine est nécessaire à la libération de la molécule active, SN-38. L'activité antitumorale de la molécule est donc dépendante de l'activité de l'enzyme impliquée dans le clivage du précurseur, la carboxylestérase. Plusieurs travaux attestent d'une diminution de la conversion de l'irinotécan en SN-38 dans diverses lignées tumorales en lien avec une altération de l'expression/activité de la carboxylestérase (15). La protéine p53 possédant des éléments de réponse fonctionnels dans le gène codant pour la carboxylestérase, on peut penser que l'inactivation de cette voie par les facteurs de transcription embryonnaires provoque une altération de l'activité de l'enzyme ayant pour effet un déficit de conversion de l'irinotécan en SN-38 (16).

Le métabolisme des cellules tumorales entraîne également un changement concernant la production lipidique, notamment celle des céramides. Ces sphingolipides sont impliqués dans la médiation d'un large éventail de réponses biologiques, telles que la prolifération, la différenciation, la réponse immune, la sénescence ainsi que l'apoptose en réponse à divers stimuli extracellulaires (17). L'altération des voies de signalisation dépendantes des céramides ainsi que la diminution de leur synthèse provoquent des phénomènes de chimiorésistance (18). Parallèlement, l'induction d'une TEM a été montrée comme induisant une baisse significative de la production des céramides (19). En cela, **la TEM, par le biais de remaniements métaboliques profonds, conduit à une inhibition de la réponse thérapeutique de différentes molécules issues de diverses classes thérapeutiques.**

Les modifications métaboliques sont également à l'origine d'évolutions profondes en termes d'interaction de la cellule avec son microenvironnement. La TEM est en effet capable d'altérer l'expression mais aussi l'activité des récepteurs aux estrogènes, inhibant ainsi la survie et la prolifération cellulaires soutenues par les stéroïdes sexuels. En cela, les FT-TEM et l'induction d'une TEM induisent une résistance aux molécules couramment utilisées dans les protocoles d'hormonothérapie (20). Globalement, toutes ces études démontrent que l'engagement des cellules



**Figure 1.** Propriétés conduisant au phénomène de chimiorésistance. L'engagement des cellules en TEM est clairement associé à une augmentation de la prévalence des résistances aux traitements classiques en oncologie. Les mécanismes y conduisant sont généralement multifactoriels et résultent de l'activité intrinsèque des facteurs de transcription embryonnaires et/ou de la reprogrammation génique associée.



**Figure 2.** Schéma récapitulatif des stratégies visant le processus de TEM.

**A.** Cibler les voies de signalisation de la TEM et les inducteurs associés. L'inhibition des voies de signalisation conduisant à l'activation des inducteurs de TEM ou l'inactivation de ces derniers pourrait empêcher l'engagement des cellules dans le processus de TEM et/ou réactiver les systèmes de sauvegarde cellulaires.

**B.** Inhiber la reprogrammation génétique. L'utilisation d'anti-histones désacétylases (anti-HDAC) pourrait inhiber le remodelage de la chromatine nécessaire à la reprogrammation des cellules.

**C.** Éliminer spécifiquement les cellules en TEM. L'identification de récepteurs et d'antigènes, exprimés à la surface des cellules mésenchymateuses de façon spécifique, fournirait des outils indispensables à la conception de vecteurs (liposomes, nanoparticules) capables d'acheminer des molécules thérapeutiques (par exemple, la salinomycine) pouvant éradiquer les cellules en TEM.

**D.** Favoriser la différenciation. L'administration d'agents différenciants (par exemple, l'acide rétinoïque) pourrait forcer les cellules à s'engager dans un mécanisme de différenciation et ainsi limiter leur plasticité et, en conséquence, leur adaptabilité.

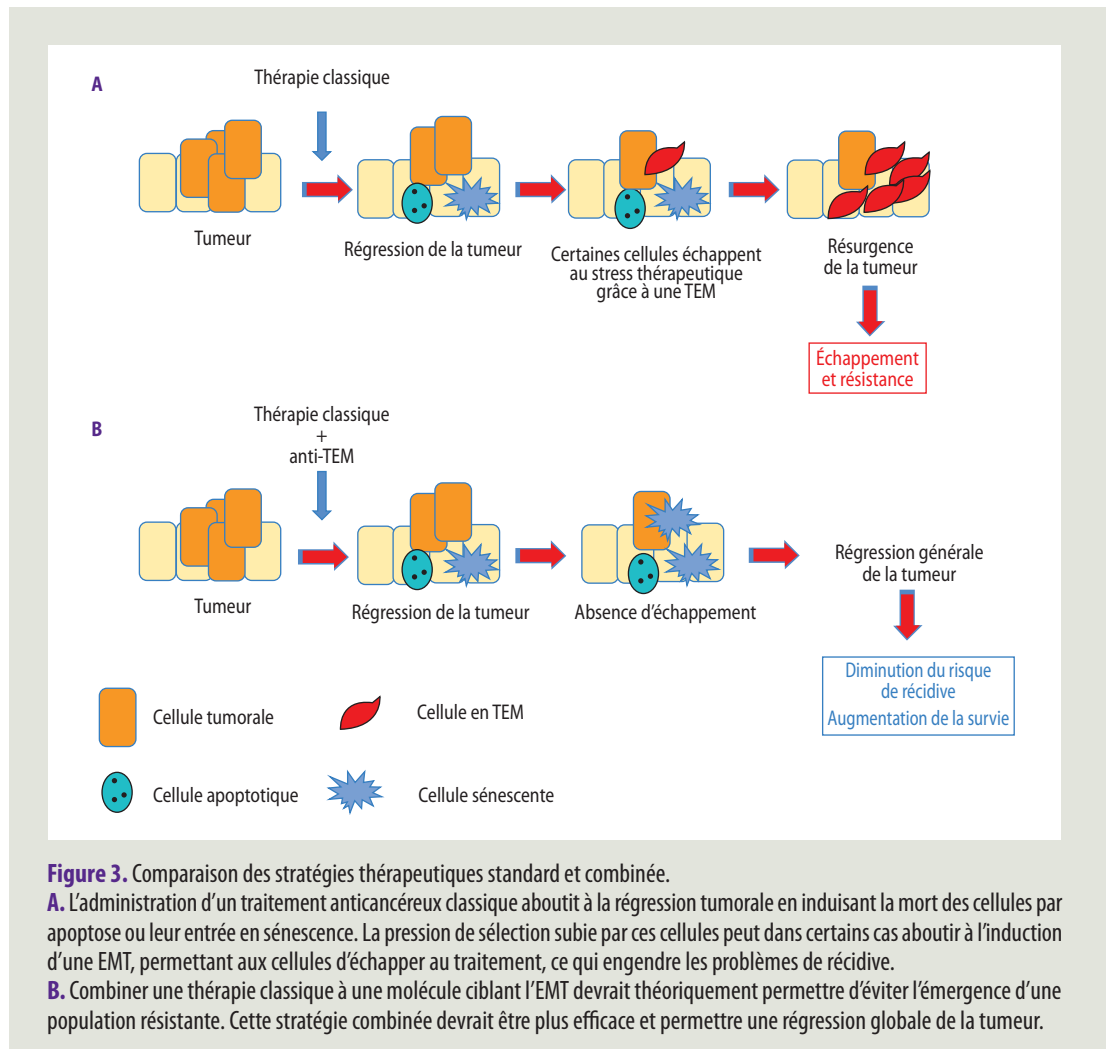
dans le phénomène de TEM est clairement associé à une augmentation de la prévalence des résistances aux traitements classiques en oncologie. Les mécanismes y conduisant sont multiples, interconnectés, et, pour un seul médicament, la résistance est souvent multifactorielle (**figure 1**). De plus, ces mécanismes touchent une proportion élevée de molécules issues de diverses classes thérapeutiques, faisant de la TEM et de ses inducteurs une cause de chimiorésistance globale à part entière. Cependant, les études menées sont encore trop souvent descriptives et n'établissent pas de mécanisme clairement défini. De plus, il reste difficile de différencier les résistances liées aux propriétés intrinsèques des facteurs de transcription embryonnaires de ceux qui sont davantage dus à l'engagement des cellules dans le programme de TEM. Des pistes quant à l'élaboration de stratégies visant la TEM et ses inducteurs sont malgré tout d'ores et déjà à l'étude.

## Stratégies ciblant la TEM

Au vu des précédentes observations, il semble pertinent de concevoir et d'évaluer des stratégies thérapeutiques ciblant la TEM par différentes approches, tant pour inhiber son potentiel transformant que pour limiter ses répercussions en termes de chimiorésistance.

Un des premiers axes de recherche a été de se focaliser sur le ciblage des voies de signalisation régulant la TEM (**figure 2A**). Ces voies sont très fortement interconnectées, ce qui peut présenter à la fois de nombreux avantages et tout autant d'inconvénients. Cette connectivité pourrait fournir de manière idéale une cible commune permettant d'enrayer, ou tout au moins de perturber, toute la cascade de régulation de la TEM. Cependant, l'abondance des intercommunications entre ces voies représente un processus d'échappement idéal. De plus, ces voies sont fréquemment mutées dans divers cas de cancers ; le masquage du site visé ou un taux d'ex-





pression aberrant de la cible peut, en conséquence, considérablement réduire l'efficacité de la drogue. De nombreuses molécules visant ces voies sont déjà sur le marché (erlotinib, trastuzumab, rapamycine, etc.) et présentent déjà, pour certaines d'entre elles, des résistances majeures. Malgré ces observations, certains laboratoires tentent de cibler les voies inductrices de TEM via différentes approches, dont certaines sont en cours d'évaluation clinique (21).

Une stratégie alternative consisterait à inactiver les FT-TEM et, par ce biais, la TEM associée (figure 2A, p. 135). L'absence d'expression de ces facteurs de transcription dans la majorité des tissus sains pourrait, a priori, limiter la toxicité de telles approches. Leur neutralisation pourrait en particulier permettre de restaurer les mécanismes de sauvegarde que sont la sénescence et l'apoptose (22, 23). L'intérêt d'approches visant à restaurer ces mécanismes a été validé sur des modèles

murins dans lesquels l'expression de la protéine oncosuppressive p53 peut être régulée à souhait (24). À titre d'exemple, le neuroblastome pourrait représenter un modèle adéquat pour l'évaluation de ce type de stratégies ciblées, car le gène *TWIST1* est spécifiquement et invariablement associé à l'amplification du gène *N-MYC* et l'extinction de l'expression de *TWIST1* in vitro induit la mort des cellules par apoptose (25). L'inhibition de l'expression du gène *ZEB1* par interférence ARN permet également de restaurer un mécanisme de sénescence, de revenir à un phénotype épithélial et de réinstaurer une certaine sensibilité aux molécules thérapeutiques classiques (26). Parallèlement, la coadministration de paclitaxel et l'extinction du gène *TWIST1* entraînent in vivo une diminution de la prise tumorale et de la dissémination métastatique (27) [figure 3]. Au-delà de la difficulté de cibler des protéines nucléaires, la redondance et l'inter-régulation des facteurs de transcription

embryonnaires sont une nouvelle fois susceptibles de déjouer certaines stratégies. Par ailleurs, l'inhibition de ces facteurs pourrait avoir, dans certains cas, l'effet inverse de celui escompté, la réversion vers un phénotype épithélial favorisant la colonisation des sites secondaires (2, 3).

D'autres approches visent à inhiber l'engagement des cellules dans le programme de TEM ou à les éradiquer. Le changement phénotypique est associé à une reprogrammation génique complète, impliquant divers mécanismes épigénétiques, dont des restructurations de la chromatine (figure 2B, p. 135). Le traitement de cellules en TEM par un inhibiteur d'histones désacétylases permet la restauration de l'expression de l'E-cadhérine et de la sensibilité au gefitinib (8). Cette stratégie reste cependant à valider dans d'autres modèles expérimentaux. Des expériences de criblage à haut débit visant à identifier des molécules susceptibles d'éliminer préférentiellement les cellules mésenchymateuses ont débouché sur l'identification de la salinomycine, validée depuis sur divers modèles expérimentaux (figure 2C, p. 135) [28-30]. Les premières analyses révèlent des effets collatéraux sur les cellules épithéliales adjacentes conduisant une nouvelle fois à l'émergence de cellules résistantes liée à l'expression des facteurs de transcription embryonnaires et à l'activation de la voie AKT (29). D'autres recherches sont actuellement en cours pour identifier des récepteurs ou antigènes permettant un ciblage spécifique des cellules mésenchymateuses. En supposant que la plasticité cellulaire conférée par la TEM contribue à la transformation cellulaire, on peut également se poser la question de l'intérêt de limiter cette plasticité en forçant les cellules à s'engager dans un mécanisme de différenciation. Cette approche est

utilisée avec succès dans le traitement des différents types de leucémie, où elle permet de différencier les précurseurs leucocytaires afin de potentialiser l'effet des protocoles thérapeutiques classiques. En outre, le traitement de cellules embryonnaires mises en culture en présence d'acide rétinolique diminue la proportion de cellules mésenchymateuses, ce qui vient étayer cette hypothèse (31). À la suite de ces observations, il serait intéressant de traiter par des agents différenciants des cellules tumorales ayant subi une TEM puis d'étudier leur potentiel de transformation (figure 2D, p. 135).

## Discussion et perspectives

L'induction aberrante de la TEM présente de multiples effets néfastes sur la progression tumorale, qu'il s'agisse de l'initiation, du développement de la tumeur primaire, de la dissémination métastatique ou du risque de récurrence (1). Ses rôles clés dans la progression tumorale lui valent d'être de plus en plus étudiée tant au niveau de ses mécanismes de régulation que de ses conséquences. Le concept de TEM en tant que nouvelle cible thérapeutique prend donc tout son sens. Néanmoins, l'importante interconnexion des voies régulant ce mécanisme ainsi que l'inter-régulation des FT-TEM introduisent de multiples possibilités d'échappement. Certaines des stratégies envisagées laissent cependant entrevoir un espoir et même une forte présomption quant à leur faisabilité. Les progrès réalisés dans le criblage et la conception rationnelle de nouvelles molécules devraient apporter rapidement de nouvelles solutions fiables dans l'optimisation de la prise en charge et de la survie des patients. ■

Ce travail est financé par la Ligue nationale contre le cancer et conduit dans le cadre du LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) de l'université de Lyon au sein du programme "Investissements d'avenir" (ANR-11-IDEX-0007) géré par l'Agence nationale de la recherche. L'activité de L. Jacqueroud est financée par la Ligue nationale contre le cancer. Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## RÉFÉRENCES

1. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5):871-90.
2. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 2012;22(6):725-36.
3. Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prx1. *Cancer Cell* 2012;22(6):709-24.
4. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(5):555-62.
5. Schafer ZT, Grassian AR, Song L et al. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* 2009;461(7260):109-13.
6. McConkey DJ, Choi W, Marquis L et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(3-4):335-44.
7. Ansieau S, Morel AP, Hinkal G, Bastid J, Puisieux A. TWISTing an embryonic transcription factor into an oncogene. *Oncogene* 2010;29(22):3173-84.
8. Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2006;66(2):944-50.
9. Yang AD, Fan F, Camp ER et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006;12(14 Pt 1):4147-53.
10. Li QQ, Chen ZQ, Cao XX et al. Involvement of NF-κB/miR-448 regulatory feedback loop in chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Cell Death Differ* 2011;18(1):16-25.
11. Cui SY, Huang JY, Chen YT et al. Let-7c governs the acquisition of chemo- or radioresistance and epithelial to mesenchymal transition (EMT) phenotypes in docetaxel-resistant lung adenocarcinoma. *Mol Cancer Res* 2013;11(7):699-713.
12. Sun SS, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Lee JK, Kao CH. Expression of mediated P-glycoprotein multidrug resistance related to Tc-99m MIBI scintimammography results. *Cancer Lett* 2000;153(1-2):95-100.



Retrouvez l'intégralité des références bibliographiques sur [www.edimark.fr](http://www.edimark.fr)

# La transition épithélio-mésenchymateuse : de la plasticité à la chimiorésistance

## RÉFÉRENCES

13. Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(13):917-31.
14. Saxena M, Stephens MA, Pathak H, Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* 2011;2:e179.
15. Niimi S, Nakagawa K, Sugimoto Y et al. Mechanism of cross-resistance to a camptothecin analogue (CPT-11) in a human ovarian cancer cell line selected by cisplatin. *Cancer Res* 1992;52(2):328-33.
16. Choi W, Cogdell D, Feng Y, Hamilton SR, Zhang W. Transcriptional activation of the carboxylesterase 2 gene by the p53 pathway. *Cancer Biol Ther* 2006;5(11):1450-6.
17. Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 2002;110(1):3-8.
18. Cai Z, Bettaieb A, Mahdani NE et al. Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of human breast carcinoma MCF7 cells to tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated cytotoxicity. *J Biol Chem* 1997;272(11):6918-26.
19. Guan F, Handa K, Hakomori SI. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(18):7461-6.
20. Vesuna F, Lisok A, Kimble B et al. Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- $\alpha$ . *Oncogene* 2012;31(27):3223-34.
21. Sabbah M, Emami S, Redeuilh G et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat* 2008;11(4-5):123-51.
22. Tran PT, Shroff EH, Burns TF et al. Twist1 suppresses senescence programs and thereby accelerates and maintains mutant Kras-induced lung tumorigenesis. *PLoS Genet* 2012;8(5):e1002650.
23. Ansieau S, Bastid J, Doreau A et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008;14(1):79-89.
24. Xue W, Zender L, Miething C et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007;445(7128):656-60.
25. Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004;6(6):625-30.
26. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009;69(14):5820-8.
27. Shen J, Sun H, Xu P et al. Simultaneous inhibition of metastasis and growth of breast cancer by co-delivery of twist shRNA and paclitaxel using pluronic P85-PEI/TPGS complex nanoparticles. *Biomaterials* 2013;34(5):1581-90.
28. Gupta PB, Onder TT, Jiang G et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009;138(4):645-59.
29. Kuo SZ, Blair KJ, Rahimy E et al. Salinomycin induces cell death and differentiation in head and neck squamous cell carcinoma stem cells despite activation of epithelial-mesenchymal transition and Akt. *BMC Cancer* 2012;12:556.
30. Kusunoki S, Kato K, Tabu K et al. The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells. *Gynecol Oncol* 2013;129(3):598-605.
31. Romano LA, Runyan RB. Slug is an essential target of TGF $\beta$ 2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol* 2000;223(1):91-102.



### **III. Thérapie ciblée des cancers.**

#### **La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigenèse.**

La transition épithélio-mésenchymateuse (ou EMT) est un mécanisme de conversion cellulaire permettant, de manière transitoire, donc par définition réversible, à des cellules épithéliales polarisées et jointives de s'individualiser et d'acquérir un potentiel de motilité. Ce mécanisme dit de transdifférenciation est essentiel à la mise en place des feuillettes et des différents organes au cours du développement embryonnaire. La réactivation aberrante de ce programme embryonnaires dans des tissus adultes différenciés est susceptible de conduire à l'émergence de conditions pathologiques telles que la fibrose, l'initiation et la progression tumorale ou encore l'émergence de métastases. La comparaison des mécanismes de régulation de l'EMT physiologique (au stade embryonnaire) ou au niveau pathologique montre que l'activation aberrante de ce processus est davantage le résultat de la dérégulation des voies de signalisation que l'émergence de voies nouvellement induites.

# La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigenèse

**Stéphane Ansieau  
et Laurent Jacqueroud**

UMR Inserm 1052, CNRS  
5286, Centre de recherche  
en Cancérologie  
de Lyon, Lyon

La transition épithélio-mésenchymateuse (ou EMT) est un mécanisme de conversion cellulaire permettant, de manière transitoire, donc par définition réversible, à des cellules épithéliales polarisées et jointives de s'individualiser et d'acquérir un potentiel de motilité. Ce mécanisme dit de trans-

différenciation est essentiel à la mise en place des feuilletts et des différents organes au cours du développement embryonnaire. Les deux exemples les plus communément cités sont la formation du mésoderme au cours de la gastrulation et la délamination de la crête neurale [1].

**EMT** *epithelial to  
mesenchymal transition.*

Bien que ce chapitre n'ait pas pour objectif de détailler l'importance de l'EMT dans le développement embryonnaire, il est à noter qu'au cours de l'embryogenèse, les cellules épithéliales s'engagent dans plusieurs cycles successifs d'EMT et de MET (pour transition mésenchymato-épithéliale), soulignant la facilité avec laquelle ces cellules passent d'un état à un autre. Nous reviendrons dans le contexte de la progression tumorale sur l'importance de cette plasticité cellulaire et de ses conséquences sur l'efficacité des traitements thérapeutiques. La capacité de ces cellules épithéliales à survivre lors de leur migration puis à s'adapter à leur nouvel environnement pour donner naissance à un épithélium secondaire n'est, par ailleurs, pas sans rappeler la dissémination de cellules cancéreuses et la colonisation de sites secondaires. Nous verrons ainsi que les potentiels oncogéniques et pro-métastatiques des régulateurs clés de l'EMT sont en fait la réminiscence de leurs fonctions embryonnaires, laissant entrevoir certains cancers comme des maladies du développement (**Figure 1**).

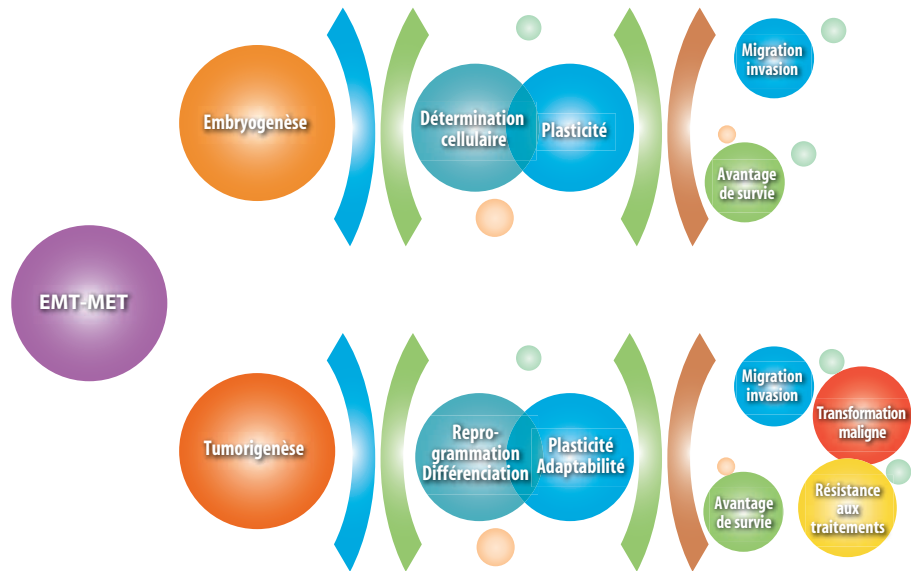
## La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigenèse



■ **Figure 1. Mise en parallèle des propriétés associées à l'EMT au cours de l'embryogenèse et de la tumorigenèse.**  
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse ; MET : transition mésenchymato-épithéliale. ■

## Fonctions embryonnaires des inducteurs d'EMT

Pour que l'EMT permette l'évolution de structures épithéliales dans le temps et l'espace au cours du développement embryonnaire, ce programme nécessite que les cellules épithéliales soient capables de répondre de manière appropriée et coordonnée à de multiples signaux. Pour ce faire, vont intervenir différents types de récepteurs activés par divers cytokines et facteurs de croissance [1, 2]. Les cohésions intercellulaires jouent également un rôle déterminant, en particulier les jonctions serrées et l'un de leurs constituants, la E-cadhérine. Sa perte d'expression est en général considérée comme l'étape ultime du programme d'EMT. D'ailleurs, son extinction obtenue artificiellement suffit, dans certains modèles cellulaires, à promouvoir l'EMT et à accorder aux cellules un avantage de survie au cours de leur migration [3]. L'activation de l'ensemble de ces récepteurs



**EMT-TF** facteurs de transcription capables d'induire l'EMT.

**TWIST** : facteurs de transcription à domaine basique hélice-boucle-hélice ; 2 protéines TWIST1 et TWIST2. Leur nom provient à l'origine de la torsion de l'abdomen (*Twist* en anglais) observée chez la drosophile suite à la délétion du gène ancestral *twi*.

**SNAIL** : la famille Snail regroupe trois facteurs de transcription SNAIL1 (ou SNAIL), SNAIL2 (ou SLUG) et SNAIL3 (ou SMUC). Ces protéines se caractérisent par un domaine de fixation à l'ADN constitué de 4 à 6 doigts de zinc et d'un domaine de trans-répression appelé domaine SNAG.

**ZEB** : la famille Zeb regroupe deux protéines ZEB1 et ZEB2. Ces protéines se caractérisent de nouveau par un domaine de fixation à l'ADN constitué de doigts de zinc et par la présence d'un homéodomaine, probablement impliqué dans des interactions protéine-protéine.

**TGF** : *transforming growth factor*. Cytokine pro-EMT.

conduit en aval à l'induction de multiples voies de signalisation fortement interconnectées. Malgré la complexité de ce réseau, il converge invariablement vers un nombre limité de facteurs de transcription (que nous appellerons EMT-TF) et la modulation de l'expression de leurs gènes cibles. Ces EMT-TF sont principalement organisés en trois familles nommées TWIST, SNAIL et ZEB, même si régulièrement de nouveaux régulateurs sont identifiés [1, 2]. L'étude de leurs propriétés intrinsèques s'avère difficile au vu de leur capacité à s'inter-réguler [4]. Leur contribution relative au programme d'EMT varie. Les protéines SNAIL et ZEB sont ainsi aujourd'hui considérées comme les réels inhibiteurs de l'activité transcriptionnelle du gène de la E-cadhérine (*CDH1*) tandis que les protéines TWIST semblent davantage associées à l'induction de marqueurs mésenchymateux. Dans des cellules épithéliales mammaires, la protéine SNAIL1 a été définie comme essentielle à l'induction de l'EMT en réponse à un traitement au TGF- $\beta$ , et la protéine TWIST1 requise au maintien du phénotype mésenchymateux [5]. Nous aurons l'occasion de revenir sur la conséquence de ces différences fonctionnelles sur l'expression de *SNAIL1* et de *TWIST1* en termes de facteurs pronostiques de risque métastatique. La régulation de l'EMT est également régie par différentes boucles de rétrocontrôle entre micro-ARN (miRNA) et inducteurs d'EMT. Selon les signaux du micro-environnement reçus (stress oxydatif, induction de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ ), l'équilibre entre ces composantes varie, les cellules évoluant en conséquence vers un phénotype ou un autre [6-8]. Le niveau d'expression et d'activation des récepteurs et des voies de signalisation en aval, le taux d'induction des différents gènes embryonnaires, voire le statut génétique de la cellule (dans le cadre des cellules cancéreuses), définissent le degré de plasticité des cellules et leur adaptabilité aux changements micro-environnementaux. Plutôt qu'un équilibre entre deux états phénotypiques, l'EMT apparaît donc comme un ensemble d'états cellulaires distincts, reflets de multiples niveaux de reprogrammation. À ce titre, la comparaison des profils géniques de cellules mammaires engagées dans un programme d'EMT en réponse à différents stimuli, traitement au TGF- $\beta$  ou expression de différents EMT-TF, révèle une certaine hétérogénéité [4]. Si une signature génique commune a pu être établie, chacun des profils observés n'est que le reflet d'un état physiologique particulier.

La définition de facteurs de transcription embryonnaires repose principalement sur le fait que leur expression est indispensable au développement prénatal. Leur contribution relative aux multiples fonctions associées à l'EMT au cours du développement embryonnaire varie d'une espèce à l'autre. Au sein même d'une famille, la prédominance des différents membres peut également évoluer. Les protéines SNAIL2 et SNAIL1 sont ainsi respectivement indispensables

## La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigenèse

à la mise en place du mésoderme au cours de la gastrulation chez le poulet et la souris [1]. La sévérité du phénotype associé à la délétion de l'un ou de l'autre de ces gènes dépend en réalité des spécificités et redondances fonctionnelles existant entre membres d'une famille. Notons qu'au-delà de l'EMT, ces facteurs de transcription assurent d'autres fonctions. Au cours de la formation du tube neural, les EMT-TF sont non seulement impliqués dans l'étape de délamination mais également dans la survie des cellules en migration et leur détermination [9, 10]. Ces facteurs peuvent également inhiber ou, à l'inverse, contribuer à divers programmes de différenciation [10-13]. Cette capacité à moduler le devenir cellulaire constitue sans nul doute l'autre caractéristique fonctionnelle déterminante des EMT-TF.

---

Les trois principales fonctions embryonnaires des inducteurs d'EMT, promouvoir la dissémination des cellules, leur survie et moduler leur devenir, constituent les bases de leurs activités oncogéniques et pro-métastatiques.

---

## Conséquences de la réactivation du programme embryonnaire dans les cancers

Les EMT-TF étaient généralement décrits comme indétectables dans les tissus adultes, une simplification encore parfois utilisée et inappropriée. Ces facteurs se retrouvent dans certains précurseurs adultes, dans les dérivés du mésoderme mais également dans un ensemble de cellules différenciées, reflet de fonctions spécifiques [1]. La protéine SNAIL2 régule ainsi le programme de différenciation mélanocytaire [10, 11]. La protéine TWIST1 est exprimée dans la graisse brune et y joue un rôle déterminant dans la thermogenèse [14]. Elle contribue également à l'intégrité des vaisseaux en assurant la cohésion intercellulaire des cellules endothéliales [15]. Les fibroblastes dans différents tissus (sein, endomètre, intestin) expriment également les protéines ZEB [16, 17]. Leurs fonctions dans ce contexte restent encore à définir. Que la très large majorité de ces facteurs embryonnaires soit à l'inverse indétectable dans les cellules épithéliales dans des conditions d'homéostasie est indiscutable. La seule exception est la protéine SNAIL2 qui participe au mécanisme de cicatrisation (kératinocytes) et orchestre la différenciation tubulaire des cellules épithéliales mammaires [18, 19]. Si ces facteurs sont absents des cellules épithéliales adultes saines, à l'inverse les gènes codants sont fréquemment réactivés dans différents types de carcinomes (sein, poumon, colon, rein, ORL). Leur induction aberrante s'étend à d'autres types de modèles tumoraux dont des sarcomes, mélanomes, gliomes et neuroblastomes [1]. En lien avec leurs fonctions embryonnaires, ces facteurs de transcription ont été à l'origine décrits comme dotés de propriétés pro-métastatiques [20], depuis confirmées dans une pléiade d'études menées sur de multiples

## Métastases

modèles cellulaires. Ces études donnent évidemment un rationnel à la détection de cellules engagées dans un programme d'EMT sur les fronts invasifs de tumeurs [21]. L'EMT a depuis été associée à d'autres étapes de la dissémination métastatique, à savoir l'intravasation, la survie des cellules dans les flux circulatoires et l'extravasation [22]. Par définition, les métastases issues de carcinomes étant des carcinomes, un retour vers un statut épithélial (MET) était donc supposé précéder la colonisation du site secondaire. Si l'idée d'une succession d'EMT et de MET était communément acceptée, la démonstration expérimentale n'a été apportée que récemment par le biais de souris transgéniques : en traçant des cellules épithéliales mammaires au cours de la progression tumorale d'une part [23] et en suivant les conséquences du maintien d'un phénotype mésenchymateux sur le développement de métastases d'autre part [24]. La difficulté de différencier une cellule en EMT d'une cellule stromale en termes de morphologie reste toutefois une difficulté pour s'assurer définitivement de la pertinence de l'EMT *in vivo*. En outre, l'engagement de cellules dans une EMT partielle, maintenant par définition une morphologie épithéliale malgré des contacts intercellulaires réduits et exprimant conjointement des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, complique encore la mise en évidence de ce programme au sein des tumeurs. Par ailleurs, nombreux sont ceux qui soulignent la difficulté de détecter des cellules individualisées sur les fronts invasifs. Depuis peu émerge l'idée selon laquelle la migration collective des cellules constituerait le principal mode de dissémination. Ce type de migration impliquerait l'engagement partiel des cellules dans un programme d'EMT [25, 26].

En favorisant l'initiation de la cascade métastatique, on aurait pu s'attendre à ce que l'induction de ces gènes embryonnaires constitue invariablement un facteur de mauvais pronostic. Si une signature transcriptomique associée à l'EMT [4] est effectivement associée à un mauvais pronostic pour des patients atteints de cancers du sein du sous-type basal B/*claudin-low*, cette association n'est pas toujours retrouvée. Plusieurs explications peuvent être apportées. Les analyses transcriptomiques généralement menées ne prennent en considération ni les régulations post-transcriptionnelles, ni les régulations post-traductionnelles qui régissent l'expression des EMT-TF. En d'autres termes, la détection d'un transcrit ne se traduit pas automatiquement par la production de la protéine, de surcroît active. Par ailleurs, les EMT-TF peuvent contribuer à l'initiation ou au maintien de l'EMT [5]. Les facteurs impliqués dans l'EMT apparaissent comme des facteurs de mauvais pronostic lorsqu'ils sont détectés soit au niveau de la tumeur primaire en favorisant la cascade métastatique – c'est le cas de la protéine SNAIL1 dans le cancer du sein – soit dans les cellules disséminées en maintenant un phénotype

### La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigénèse

mésenchymateux – c'est le cas de la protéine TWIST1 – [5]. Enfin, d'autres fonctions oncogéniques sont associées à ces facteurs embryonnaires. De par leur capacité à inhiber l'induction d'inhibiteurs de cycline kinase, plusieurs d'entre eux accordent aux cellules un avantage prolifératif et leur permettent d'échapper à la sénescence induite en réponse à une activation oncogénique [27, 28]. La capacité de la protéine TWIST1 à moduler l'activité de la protéine p53 à différents niveaux (stabilisation, activation post-traductionnelle, fixation à ces éléments de réponse, activation de ses gènes cibles) fait que l'induction aberrante du gène embryonnaire est désormais considérée comme l'un des mécanismes récurrents d'inactivation fonctionnelle de la protéine p53 et, en tant que tel, une étape clé dans l'initiation tumorale [27, 29-31]. L'un des meilleurs exemples est le neuroblastome où l'amplification du gène *N-MYC* est invariablement associée à l'induction du gène *TWIST1* dans les tumeurs de mauvais pronostic. En neutralisant la protéine p53, la protéine TWIST1 annihile l'activité pro-apoptotique de la protéine N-MYC, octroie de fait aux cellules un avantage de survie et contribue ainsi à la progression tumorale [30]. Cette capacité à promouvoir la prolifération et la survie des cellules n'est pas limitée au modèle du neuroblastome puisque l'inhibition de l'expression du gène dans des lignées tumorales mammaires, de mélanome, de sarcome et dans un modèle de carcinogénèse pulmonaire induit la mort des cellules ou leur entrée en sénescence [27, 32]. À ce titre, on pourrait se demander si l'une des principales fonctions de ce facteur au cours de l'EMT ne consisterait pas à protéger les cellules de la sénescence au cours de leur reprogrammation. D'autres fonctions oncogéniques sont également attribuées aux EMT-TF. Ils peuvent, entre autres, être dotés de propriétés pro-angiogéniques [33] en favorisant la production de VEGF et diminuer la réponse immunitaire anticancéreuse (immuno-tolérance) [34]. Les EMT-TF impactent donc différentes phases de la progression tumorale par des biais multiples (**Figure 2**). Sur la base d'expériences menées *in vitro*, il semble que ces EMT-TF aient en réalité des fonctions biphasiques, en favorisant d'une part la transformation maligne (résultat de l'inhibition des mécanismes de sauvegarde cellulaire et de la reprogrammation génique) et, d'autre part, la dissémination métastatique, dans un environnement permissif à l'EMT (**Figure 3**). Les bases moléculaires de cette coopération restent partiellement connues et, dans le cadre de carcinomes, impliqueraient en particulier des mécanismes de stabilisation des EMT-TF en réponse aux signaux émis par le stroma activé [35]. Dans le cadre du mélanome – le terme généralement employé est alors « EMT-like », les cellules n'étant pas épithéliales –, la transition est le résultat d'altérations géniques secondaires amplifiant le signal mitotique [36]. Notons que la transformation néoplasique et l'initiation de la cascade

**VEGF** vascular  
endothelium growth  
factor.



## Métastases

métastatique peuvent être concomitantes. Dans ces cas particuliers, limités à ce jour aux cancers du sein et de l'œsophage, la réactivation de gènes embryonnaires pourrait conduire à une dissémination précoce de cellules cancéreuses (ou précancéreuses) dès le stade d'hyperplasie [37, 38].

Dans l'hypothèse d'une dissémination de cellules individualisées en EMT, pour que cette cellule puisse donner naissance à une tumeur secondaire, avec une hétérogénéité similaire à la tumeur dont elle est issue, encore faut-il qu'elle soit dotée de potentiels d'auto-renouvellement et de différenciation. Ces propriétés sont celles communément attribuées aux cellules souches cancéreuses, qui ont conduit le Dr Thomas Brabletz à proposer pour la première fois en 2005 la notion de « cellule souche cancéreuse métastatique » [39]. Bien qu'aucune donnée ne puisse aujourd'hui confirmer ou infirmer cette possibilité, de nombreuses études soulignent l'existence d'une interrelation ou tout au moins d'une superposition entre programmes d'EMT et de dédifférenciation. La première démonstration fut apportée par des études menées conjointement par le laboratoire du Pr RA. Weinberg et le nôtre en 2008 dans un modèle de transformation *in vitro* de cellules épithéliales mammaires [40, 41]. L'expression successive de protéines oncovirales et d'une oncoprotéine mitogénique conduit à l'engagement des cellules en EMT et à l'acquisition conséquente de certaines propriétés de cellules souches : une capacité à générer des mammosphères en condition de faible adhérence, un phénotype antigénique à l'origine octroyé aux cellules souches mammaires et un potentiel tumorigène dans des conditions de dilution limite. Pour autant, l'EMT n'est pas toujours associée à l'acquisition de propriétés de cellules souches. Plus vraisemblablement, on peut imaginer que l'engagement des cellules en EMT et la reprogrammation associée amènent les cellules à un stade « plastique » à partir duquel elles peuvent éventuellement davantage se dédifférencier en fonction des altérations génétiques subies et du niveau d'activation de certaines voies intracellulaires. Le passage à cet état particulier pourrait être une composante importante de la transformation cellulaire et donner une explication à la dédifférenciation de cellules épithéliales et de fibroblastes observée dans des tests de transformation *in vitro* [40-42].

L'importance des reprogrammations induites par les EMT-TF dans la transformation néoplasique s'étend bien au-delà des carcinomes et de l'EMT à strictement parler. L'analyse de leurs fonctions dans la mélanomagenèse a ainsi révélé que certains d'entre eux sont essentiels à la différenciation et la survie des mélanocytes. En réponse à l'activation de la voie NRAS/BRAF récurrente dans les mélanomes, une reprogrammation des EMT-TF s'opère. Les EMT-TF normalement exprimés dans les mélanocytes disparaissent en faveur d'autres,

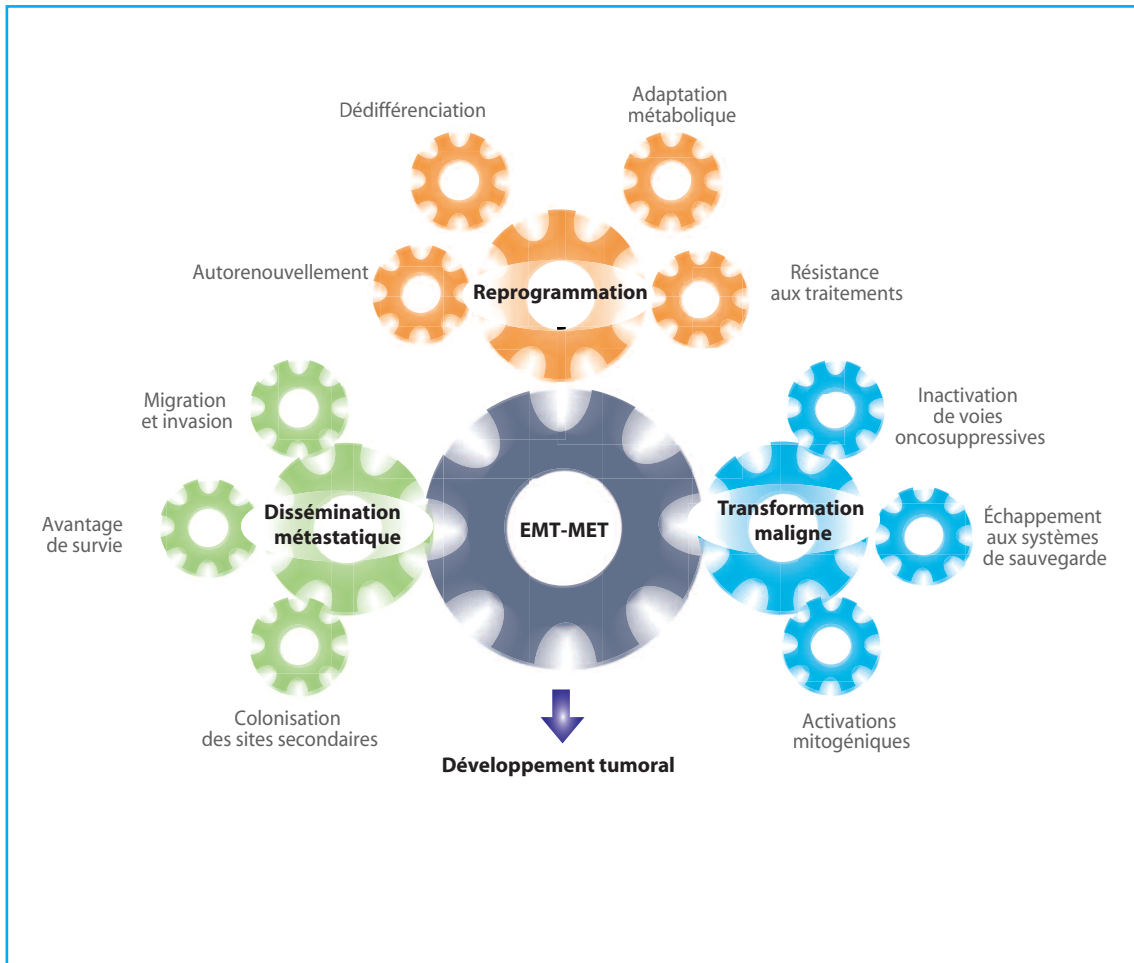
## La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigénèse



■ **Figure 2. Conséquences liées à l'induction des programmes d'EMT et de MET au cours de la progression tumorale.**  
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse ; MET : transition mésenchymato-épithéliale. ■

capables, à l'inverse, de favoriser la transformation néoplasique des cellules et leur dissémination métastatique aux dépens des programmes de différenciation. Cette transition, confirmée dans des échantillons de patients, est statistiquement associée à un facteur de mauvais pronostic. Dans ce cadre précis, les EMT-TF se comportent donc soit comme des gènes suppresseurs de tumeurs, soit comme des oncoprotéines. L'importance de la dédifférenciation et de la reprogrammation génique dans la transformation reste cependant une constante [36].

Si l'EMT se traduit éventuellement par un changement phénotypique et par l'acquisition de propriétés migratoires et invasives (pour une EMT totale), la reprogrammation génique associée a en réalité des conséquences multiples, en termes d'activation de voies de



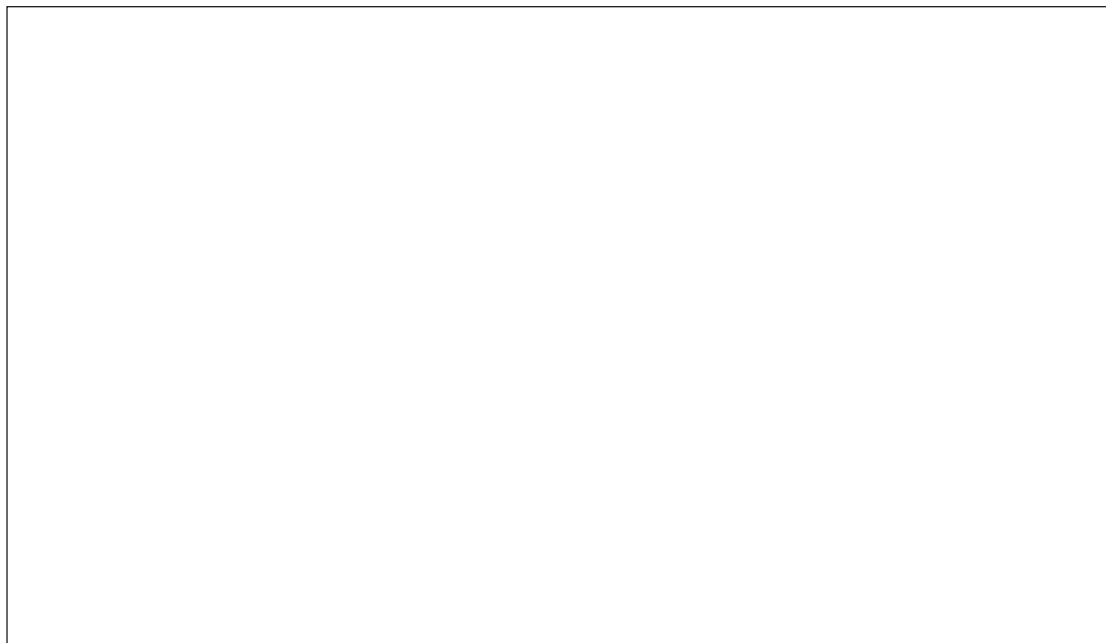
## Métastases

signalisation, de structure du cytosquelette et de métabolisme. Toutes ces modifications contribuent à octroyer aux cellules une résistance accrue aux traitements thérapeutiques, en déjouant l'effet de drogues dirigées contre certaines voies de signalisation, en inhibant l'efficacité d'agents cytotoxiques et en perturbant l'activation de pro-drogues (**Figure 4**) [43]. Cette résistance acquise est également le résultat de l'expression de transporteurs qui favorisent l'efflux des drogues mais également des propriétés intrinsèques des EMT-TF. Ces derniers activent les voies de survie dépendantes des protéines NF- $\kappa$ B et PI3K/AKT, modifient la différence de potentiel des membranes des mitochondries en altérant l'expression ou l'activité des protéines de la famille BCL2 et inhibent l'expression ou l'activité des récepteurs des œstrogènes, annihilant de fait l'efficacité des hormonothérapies [43]. Nombre de ces facteurs embryonnaires sont induits dans des conditions de stress dont les compressions mécaniques et les stress oxydatifs [1]. Il n'est donc pas surprenant que l'émergence de cellules résistantes à des traitements thérapeutiques *in vitro* soit fréquemment associée à l'EMT et que les tumeurs résistantes présentent un enrichissement en marqueurs mésenchymateux [44-46]. La plasticité cellulaire octroyée en particulier par l'engagement partiel des cellules en EMT leur permet de survivre dans un environnement hostile (intrinsèque à la tumeur ou induit par une thérapie), de se réadapter constamment aux changements micro-environnementaux, de coloniser par ce biais de nouveaux sites et d'échapper aux différents systèmes de protection élaborés par l'organisme.

## Quelles pistes pour les stratégies thérapeutiques anti-EMT ?

L'EMT étant désormais considérée comme un programme à part entière dans l'émergence de mécanismes de résistance aux thérapies classiques, l'un des enjeux à venir est de pouvoir en neutraliser les effets. Malgré les multiples stratégies envisagées *in vitro*, du ciblage de certaines voies de signalisation à l'inhibition de l'activité des facteurs de transcription embryonnaires, la complexité des voies qui régissent ce mécanisme et des interactomes élaborés par les EMT-TF diminue clairement les chances de réussite de ce type d'approche. Les seuls espoirs, à ce jour, ont été apportés par le criblage de composés chimiques capables d'éradiquer spécifiquement les cellules en EMT [47]. L'un d'entre eux, la salinomycine, un inhibiteur de pompe potassique, est actuellement en essai clinique. Si cette drogue s'avère efficace sur certaines lignées mésenchymateuses, il restera à vérifier qu'elle l'est indépendamment des signaux et/ou stress d'induction et du contexte cellulaire étudié. Puisque derrière

## La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigenèse



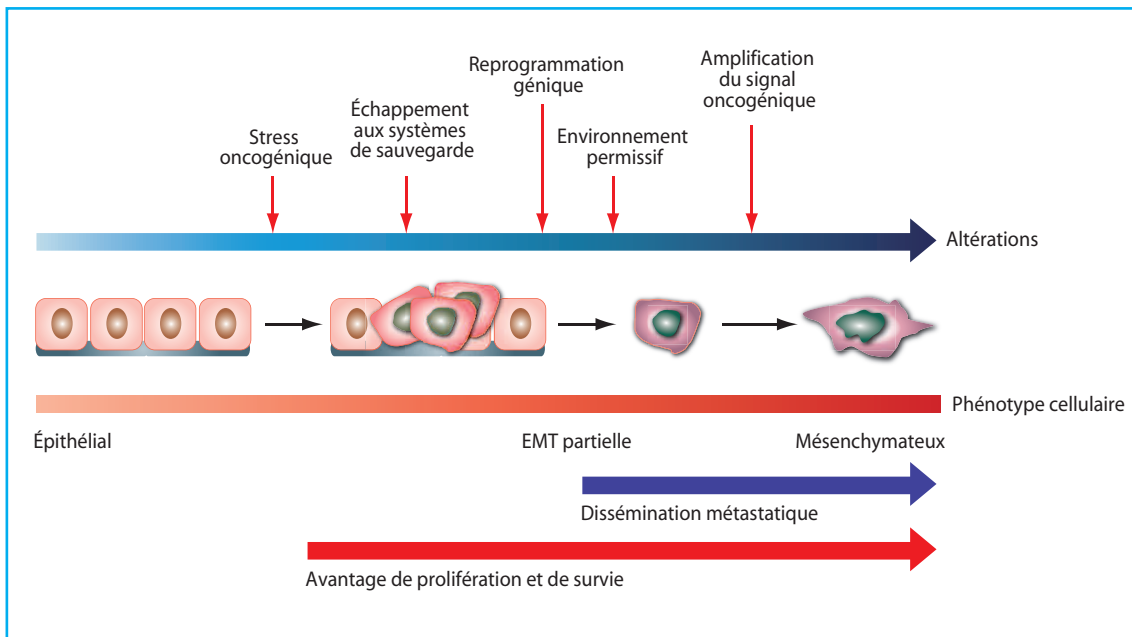
### ■ Figure 3. Fonctions biphasiques des inducteurs d'EMT.

En favorisant l'échappement aux systèmes de sauvegarde cellulaires (sénescence, apoptose) et en induisant des reprogrammations géniques, les EMT-TF favorisent la transformation maligne et accordent aux cellules des avantages de survie et de prolifération essentiels aux différentes phases de la progression tumorale. Ces fonctions se traduisent par l'engagement partiel des cellules dans un programme d'EMT (EMT partielle) avec le maintien d'une morphologie épithéliale. Adjoint à un environnement permissif lié à la production de cytokines par le stroma activé ou à l'amplification d'un signal mitotique (dans le cadre du mélanome), l'engagement dans le programme d'EMT est finalisé (EMT totale) et se traduit par l'acquisition de propriétés migratoires et invasives, conduisant à l'initiation de la cascade métastatique. EMT : transition épithélio-mésenchymateuse ; TF : facteurs de transcription. ■

le terme d'EMT se cache une diversité d'états cellulaires, définir le réel spectre d'action de cette molécule sera donc déterminant. Pour autant, l'identification d'une telle drogue constitue une avancée significative, et son efficacité en adjonction à des traitements classiques mérite sans nul doute d'être évaluée.

Si le maître mot de l'EMT est d'accorder aux cellules une plasticité exacerbée, le dessin d'une stratégie anti-EMT pourrait reposer sur sa capacité à figer les cellules dans un état avant de les soumettre à une thérapie classique. Puisque la plasticité résulte de reprogrammations géniques, des molécules visant les histone-déacétylases (comme le panobinostat ou la trichostatine A) ou les DNA méthyl transférase (comme la 5-aza cytidine) pourraient s'avérer efficaces. Dans un premier modèle de cellules de carcinome mammaire, le traitement de cellules en EMT par un inhibiteur d'histone-déacétylase restaure effectivement l'expression de la E-cadhérine et resensibilise les cellules à diverses molécules de thérapie classique [48]. Une alternative serait, sur la base du principe de la thérapie par différenciation, de parvenir à engager les cellules dans à un stade de

**Interactome** réseau complexe d'inter-régulation formé par les inducteurs d'EMT.



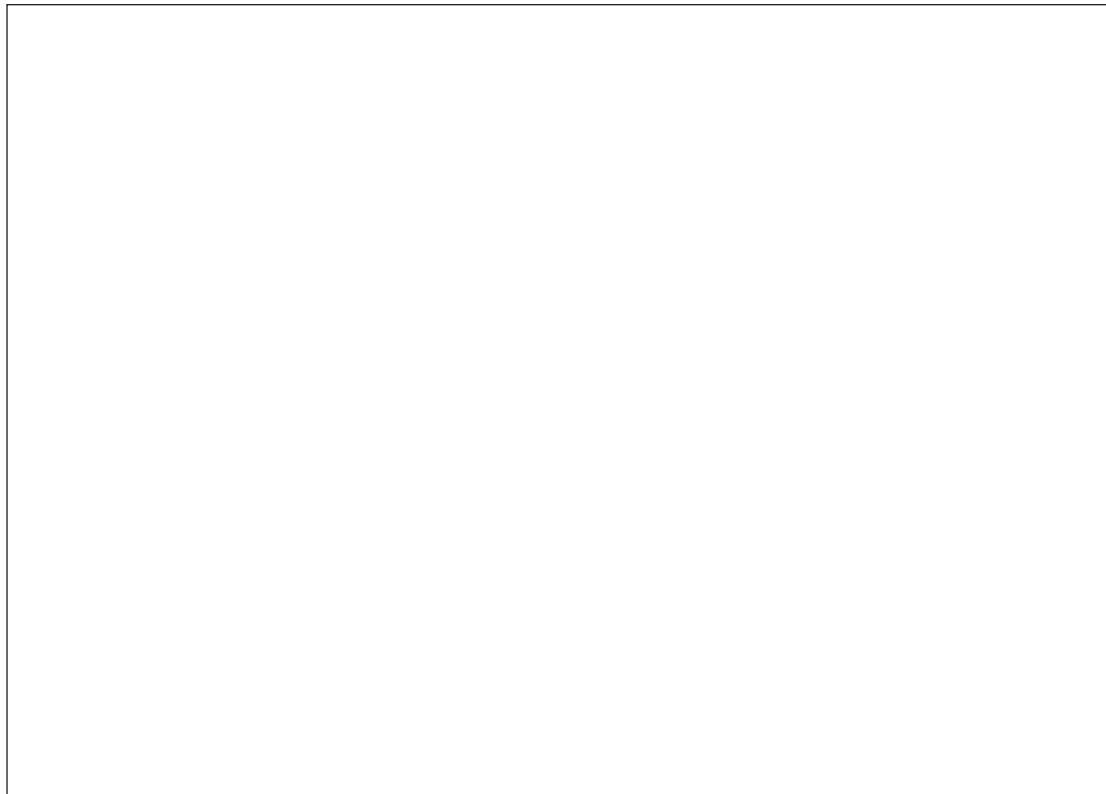
## Métastases

différenciation tel que toute plasticité soit perdue. L'acide rétinoïque semble en particulier prometteur puisque non seulement il permet la diminution du nombre de cellules mésenchymateuses issues de la mise en culture de cellules du canal atrioventriculaire de poulet mais il insensibilise aussi les cellules au traitement par une cytokine connue pour promouvoir l'EMT (le TGF- $\beta$ ) [49]. Le fait que des lignées tumorales mésenchymateuses puissent dans les conditions de culture appropriées se différencier en adipocytes, chondrocytes ou ostéocytes constitue également une observation encourageante [50]. Reste néanmoins à identifier par quels mécanismes l'activité des EMT-TF pourrait être réorientée et à trouver le moyen de mettre à profit ces informations.

## Perspectives

Analysée à l'origine à travers ses deux points ultimes que sont les états épithéliaux et mésenchymateux, la réactivation de ces programmes embryonnaires n'a longtemps été considérée que de par son rôle dans la dissémination métastatique. Au vu de l'importance de la survenue de métastases dans le devenir des patients, ce point reste à juste titre le principal étudié. Pour autant, la contribution de l'EMT dans l'initiation tumorale ainsi que les problèmes de récurrence ont, ces dernières années, mis en exergue un autre de ses aspects néfastes à savoir l'octroi aux cellules d'une plasticité exacerbée. Nul doute que les cellules les plus plastiques sont également celles les plus à même de coloniser des sites secondaires et les plus difficiles à traiter. Comprendre les composantes de cette plasticité pour mieux la déjouer sera certainement l'un des enjeux principaux pour les années à venir. ■

## La transition épithélio-mésenchymateuse : implication dans la tumorigénèse



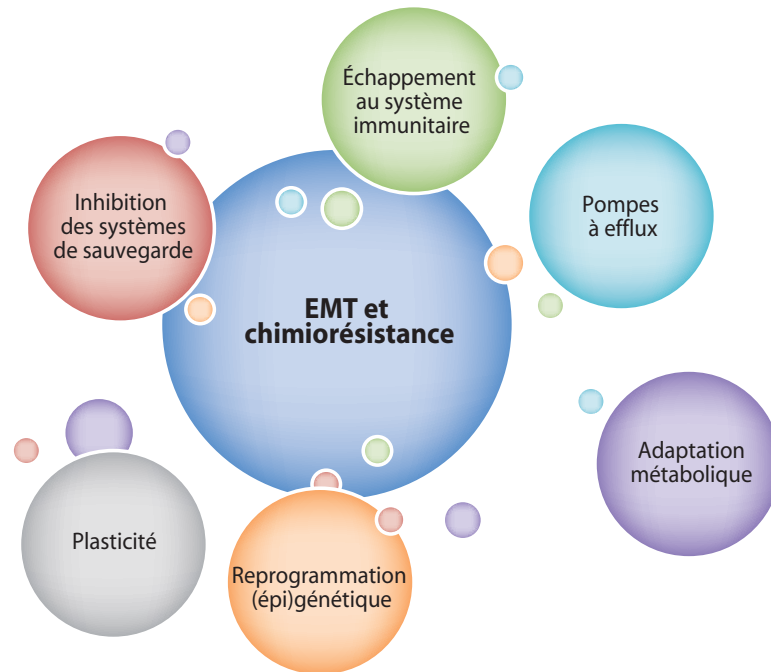
■ **Figure 4. Mécanismes divers par lesquels l'EMT favorise la résistance aux traitements thérapeutiques.**

EMT : transition épithélio-mésenchymateuse. ■

## Références

1. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009 ; 139 : 871-90.
2. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition : at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008 ; 14 : 818-29.
3. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008 ; 68 : 3645-54.
4. Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, *et al.* Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 15449-54.
5. Tran DD, Corsa CAS, Biswas H, Aft RL, Longmore GD. Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. *Mol Cancer Res* 2011 ; 9 : 1644-57.
6. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008 ; 22 : 894-907.
7. Kim NH, Kim HS, Li XY, *et al.* A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2011 ; 195 : 417-33.
8. Diaz-Martin J, Diaz-Lopez A, Moreno-Bueno G, *et al.* A core microRNA signature associated with inducers of the epithelial-to-mesenchymal transition. *J Pathol* 2014 ; 232 : 319-29.
9. Soo K, O'Rourke MP, Khoo PL, *et al.* Twist function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo. *Dev Biol* 2002 ; 247 : 251-70.
10. Perez-Losada J, Sanchez-Martin M, Rodriguez-Garcia A, *et al.* Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood* 2002 ; 100 : 1274-86.
11. Shirley SH, Greene VR, Duncan LM, Torres Cabala CA, Grimm EA, Kusewitt DF. Slug expression during melanoma progression. *Am J Pathol* 2012 ; 180 : 2479-89.
12. Spicer DB, Rhee J, Cheung WL, Lassar AB. Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 1996 ; 272 : 1476-80.
13. Bialek P, Kern B, Yang X, *et al.* A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 2004 ; 6 : 423-35.





## Métastases

14. Pan D, Fujimoto M, Lopes A, Wang YX. Twist-1 is a PPAR-delta-inducible, negative-feedback regulator of PGC-1alpha in brown fat metabolism. *Cell* 2009 ; 137 : 73-86.
15. Mammoto T, Jian E, Jiang A, et al. Twist1 controls lung vascular permeability and endotoxin-induced pulmonary edema by altering Tie2 expression. *PLoS One* 2013 ; 8 : e73407.
16. Singh M, Spoelstra NS, Jean A, et al. ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers : a marker of aggressive disease. *Mod Pathol* 2008 ; 21 : 912-23.
17. Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, et al. Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma. *BMC Cancer* 2011 ; 11 : 73.
18. Come C, Arnoux V, Bibeau F, Savagner P. Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004 ; 9 : 183-93.
19. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, et al. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 2005 ; 202 : 858-66.
20. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004 ; 117 : 927-39.
21. Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 10356-61.
22. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011 ; 331 : 1559-64.
23. Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 2008 ; 68 : 937-45.
24. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatio-temporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 2012 ; 22 : 725-36.
25. Fortier AM, Asselin E, Cadrin M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem* 2013 ; 288 : 11555-71.
26. Okui G, Tobiume K, Rizqiawan A, et al. AKT primes snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cell carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2013 ; 114 : 2039-49.
27. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008 ; 14 : 79-89.
28. Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS, et al. Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res* 2010 ; 70 : 4174-84.
29. Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 2207-17.
30. Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004 ; 6 : 625-30.
31. Piccinin S, Tonin E, Sessa S, et al. A "twist box" code of p53 inactivation : twist box : p53 interaction promotes p53 degradation. *Cancer Cell* 2012 ; 22 : 404-15.
32. Tran PT, Shroff EH, Burns TF, et al. Twist1 suppresses senescence programs and thereby accelerates and maintains mutant Kras-induced lung tumorigenesis. *PLoS Genet* 2012 ; 8 : e1002650.
33. Mironchik Y, Winnard PT Jr, Vesuna F, et al. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 10801-9.
34. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 2009 ; 15 : 195-206.
35. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* 2009 ; 15 : 416-28.
36. Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 2013 ; 24 : 466-80.
37. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008 ; 13 : 58-68.
38. Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, et al. Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 2008 ; 13 : 441-53.
39. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion : migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 744-49.
40. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008 ; 133 : 704-15.
41. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008 ; 3 : e2888.
42. Scaffidi P, Misteli T. In vitro generation of human cells with cancer stem cell properties. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 1051-61.
43. Jacquaroud L, Ansieau S. La transition épithélio-mésenchymateuse : de la plasticité à la chimiorésistance. *Correspondances en Onco-Thérapiologie* 2013 ; 3 : 126-31.
44. Watson MA, Ylagan LR, Trinkaus KM, et al. Isolation and molecular profiling of bone marrow micrometastases identifies TWIST1 as a marker of early tumor relapse in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 5001-9.
45. McConkey DJ, Choi W, Marquis L, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009 ; 28 : 335-44.
46. Helleman J, Smid M, Jansen MP, van der Burg ME, Berns EM. Pathway analysis of gene lists associated with platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer : the big picture. *Gynecol Oncol* 2010 ; 117 : 170-76.
47. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009 ; 138 : 645-59.
48. Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 944-50.
49. Yan M, Nick TG, Sinning AR. Retinoic acid inhibition of cardiac mesenchyme formation in vitro correlates with changes in the secretion of particulate matrix from the myocardium. *Anat Rec* 2000 ; 258 : 186-97.
50. Battula VL, Evans KW, Hollier BG, et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2010 ; 28 : 1435-45.

## **7ème partie : Bibliographie**

- Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* *119*, 1438–1449.
- Acosta, J.C., O’Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V, Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* *133*, 1006–1018.
- al-Gazali, L.I., and al-Talabani, J. (1996). Setleis syndrome: autosomal recessive or autosomal dominant inheritance? *Clin. Dysmorphol.* *5*, 249–253.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3983–3988.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* *14*, 79–89.
- Ansieau, S., Morel, A.-P., Hinkal, G., Bastid, J., and Puisieux, A. (2010). TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene* *29*, 3173–3184.
- Ao, M., Williams, K., Bhowmick, N.A., and Hayward, S.W. (2006). Transforming growth factor-beta promotes invasion in tumorigenic but not in nontumorigenic human prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* *66*, 8007–8016.
- Aoyagi, K., Minashi, K., Igaki, H., Tachimori, Y., Nishimura, T., Hokamura, N., Ashida, A., Daiko, H., Ochiai, A., Muto, M., et al. (2011). Artificially induced epithelial-mesenchymal transition in surgical subjects: its implications in clinical and basic cancer research. *PLoS One* *6*, e18196.
- Aoyagi, K., Tamaoki, M., Nishimura, T., and Sasaki, H. (2013). Technical considerations for analyzing EMT-MET data from surgical samples. *Cancer Lett.*
- Aref, A.R., Huang, R.Y.-J., Yu, W., Chua, K.-N., Sun, W., Tu, T.-Y., Bai, J., Sim, W.-J., Zervantonakis, I.K., Thiery, J.P., et al. (2013). Screening therapeutic EMT blocking agents in a three-dimensional microenvironment. *Integr. Biol. (Camb)*. *5*, 381–389.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* *23*, 2134–2139.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* *434*, 864–870.
- Batlle, R., Alba-Castellón, L., Loubat-Casanovas, J., Armenteros, E., Francí, C., Stanisavljevic, J., Banderas, R., Martin-Caballero, J., Bonilla, F., Baulida, J., et al. (2013). Snail1 controls TGF- $\beta$  responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells. *Oncogene* *32*, 3381–3389.

- Beck, B., Lapouge, G., Rorive, S., Drogat, B., Desaedelaere, K., Delafaille, S., Dubois, C., Salmon, I., Willekens, K., Marine, J.-C., et al. (2015). Different Levels of Twist1 Regulate Skin Tumor Initiation, Stemness, and Progression. *Cell Stem Cell* 16, 67–79.
- Benhamed, M., Herbig, U., Ye, T., Dejean, A., and Bischof, O. (2012). Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nat. Cell Biol.* 14, 266–275.
- Bialek, P., Kern, B., Yang, X., Schrock, M., Sasic, D., Hong, N., Wu, H., Yu, K., Ornitz, D.M., Olson, E.N., et al. (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev. Cell* 6, 423–435.
- Bidard, F.-C., Vincent-Salomon, A., Gomme, S., Nos, C., de Rycke, Y., Thiery, J.P., Sigal-Zafrani, B., Mignot, L., Sastre-Garau, X., and Pierga, J.-Y. (2008). Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clin. Cancer Res.* 14, 3306–3311.
- Biedler, J.L., and Riehm, H. (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30, 1174–1184.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352.
- Bouard, C., Terreux, R., Hope, J., Chemelle, J.A., Puisieux, A., Ansieau, S., and Payen, L. (2013). Interhelical loops within the bHLH domain are determinant in maintaining TWIST1-DNA complexes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 32, 226–241.
- Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A.L., Danse, J.M., Bloch-Zupan, A., Yoshida, K., Stoetzel, C., and Perrin-Schmitt, F. (1998). The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 7, 945–957.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10356–10361.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2005). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5, 744–749.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660–665.
- Brodeur, G.M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer* 3, 203–216.
- Brown, C.J., Lain, S., Verma, C.S., Fersht, A.R., and Lane, D.P. (2009). Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer* 9, 862–873.
- Brown, C.J., Cheok, C.F., Verma, C.S., and Lane, D.P. (2011). Reactivation of p53: from peptides to small molecules. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 53–62.

- Brown, J.P., Wei, W., and Sedivy, J.M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831–834.
- Browne, G., Sayan, a E., and Tulchinsky, E. (2010). ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle* 9, 886–891.
- Bullock, A.N., and Fersht, A.R. (2001). Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer* 1, 68–76.
- Burns, T.F., Dobromilskaya, I., Murphy, S.C., Gajula, R.P., Thiyagarajan, S., Chatley, S.N.H., Aziz, K., Cho, Y.-J., Tran, P.T., and Rudin, C.M. (2013). Inhibition of TWIST1 leads to activation of oncogene-induced senescence in oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer Res.* 11, 329–338.
- Butcher, D.T., Alliston, T., and Weaver, V.M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 9, 108–122.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., and Selivanova, G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat. Med.* 8, 282–288.
- Cakouros, D., Isenmann, S., Cooper, L., Zannettino, A., Anderson, P., Glackin, C., and Gronthos, S. (2012). Twist-1 induces Ezh2 recruitment regulating histone methylation along the Ink4A/Arf locus in mesenchymal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1433–1441.
- Campisi, J., and d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Cannito, S., Novo, E., Compagnone, A., Valfrè di Bonzo, L., Busletta, C., Zamara, E., Paternostro, C., Povero, D., Bandino, A., Bozzo, F., et al. (2008). Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 2267–2278.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* 24, 466–480.
- Castanon, I., and Baylies, M.K. (2002). A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene* 287, 11–22.
- Castanon, I., Von Stetina, S., Kass, J., and Baylies, M.K. (2001). Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development. *Development* 128, 3145–3159.
- Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.* 11, 319–330.
- Chang, B.D., Broude, E. V, Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I.B. (1999a). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* 59, 3761–3767.

- Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E. V, Zhu, H., Schott, B., Fang, J., and Roninson, I.B. (1999b). Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 18, 4808–4818.
- Chen, Z.F., and Behringer, R.R. (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev.* 9, 686–699.
- Chen, J.-H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S.E., Williams, G.H., and Hales, C.N. (2004). Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279, 49439–49446.
- Chen, Y., Chen, P.L., and Lee, W.H. (1994). Hot-spot p53 mutants interact specifically with two cellular proteins during progression of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6764–6772.
- Chen, Y., Li, D., Wang, D., Liu, X., Yin, N., Song, Y., Lu, S.H., Ju, Z., and Zhan, Q. (2012). Quiescence and attenuated DNA damage response promote survival of esophageal cancer stem cells. *J. Cell. Biochem.* 113, 3643–3652.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730.
- Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J., and van Deursen, J.M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 15, 1139–1153.
- Chua, H.L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S.E., Morimiya, A., Badve, S., and Nakshatri, H. (2007). NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 26, 711–724.
- Clarke, P.G., and Clarke, S. (1996). Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryol. (Berl.)* 193, 81–99.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Muentener, C., Mercado, M.A., and Spicer, D.B. (2006). Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev. Dyn.* 235, 1345–1357.
- Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Mercado, M.A., Dowell, K., Yang, X., Lindner, V., Friesel, R.E., and Spicer, D.B. (2008). Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Dev. Biol.* 318, 323–334.
- Corsi, A.K., Brodigan, T.M., Jorgensen, E.M., and Krause, M. (2002). Characterization of a dominant negative *C. elegans* Twist mutant protein with implications for human Saethre-Chotzen syndrome. *Development* 129, 2761–2772.
- Courtois-Cox, S., Genter Williams, S.M., Reczek, E.E., Johnson, B.W., McGillicuddy, L.T., Johannessen, C.M., Hollstein, P.E., MacCollin, M., and Cichowski, K. (2006). A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 10, 459–472.



- Cristofalo, V.J., and Kritchevsky, D. (1969). Cell size and nucleic acid content in the diploid human cell line WI-38 during aging. *Med. Exp. Int. J. Exp. Med.* *19*, 313–320.
- Cristofalo, V.J., Lorenzini, A., Allen, R.G., Torres, C., and Tresini, M. Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* *125*, 827–848.
- d’Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194–198.
- Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., and McMahon, M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* *21*, 379–384.
- Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, À., Beltran, M., Peiró, S., and de Herreros, A.G. (2011). Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* *286*, 12024–12032.
- Davies, J.A. (1996). Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. *Acta Anat. (Basel)*. *156*, 187–201.
- Demontis, S., Rigo, C., Piccinin, S., Mizzau, M., Sonogo, M., Fabris, M., Brancolini, C., and Maestro, R. (2006). Twist is substrate for caspase cleavage and proteasome-mediated degradation. *Cell Death Differ.* *13*, 335–345.
- Desai, A.A., and Stadler, W.M. (2006). Novel kinase inhibitors in renal cell carcinoma: progressive development of static agents. *Curr. Urol. Rep.* *7*, 16–22.
- Desprat, N., Supatto, W., Pouille, P.-A., Beaupaire, E., and Farge, E. (2008). Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in *Drosophila* embryos. *Dev. Cell* *15*, 470–477.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9363–9367.
- Drayton, S., Rowe, J., Jones, R., Vatcheva, R., Cuthbert-Heavens, D., Marshall, J., Fried, M., and Peters, G. (2003). Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. *Cancer Cell* *4*, 301–310.
- Dumont, N., Wilson, M.B., Crawford, Y.G., Reynolds, P.A., Sigaroudinia, M., and Tlsty, T.D. (2008). Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14867–14872.
- Eccles, S.A., and Welch, D.R. (2007). Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* *369*, 1742–1757.
- Eckert, M.A., Lwin, T.M., Chang, A.T., Kim, J., Danis, E., Ohno-Machado, L., and Yang, J. (2011). Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell* *19*, 372–386.



- Elmore, L.W., Rehder, C.W., Di, X., McChesney, P.A., Jackson-Cook, C.K., Gewirtz, D.A., and Holt, S.E. (2002). Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J. Biol. Chem.* *277*, 35509–35515.
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., and Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* *17*, 135–147.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* *69*, 119–128.
- Ewald, J.A., Peters, N., Desotelle, J.A., Hoffmann, F.M., and Jarrard, D.F. (2009). A high-throughput method to identify novel senescence-inducing compounds. *J. Biomol. Screen.* *14*, 853–858.
- Fang, X., Cai, Y., Liu, J., Wang, Z., Wu, Q., Zhang, Z., Yang, C.J., Yuan, L., and Ouyang, G. (2011). Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogene* *30*, 4707–4720.
- Farge, E. (2003). Mechanical induction of Twist in the *Drosophila* foregut/stomodaeal primordium. *Curr. Biol.* *13*, 1365–1377.
- Firulli, A.B., and Conway, S.J. (2008). Phosphoregulation of Twist1 provides a mechanism of cell fate control. *Curr. Med. Chem.* *15*, 2641–2647.
- Firulli, B.A., Howard, M.J., McDaid, J.R., McIlreavey, L., Dionne, K.M., Centonze, V.E., Cserjesi, P., Virshup, D.M., and Firulli, A.B. (2003). PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol. Cell* *12*, 1225–1237.
- Firulli, B.A., Krawchuk, D., Centonze, V.E., Vargesson, N., Virshup, D.M., Conway, S.J., Cserjesi, P., Laufer, E., and Firulli, A.B. (2005). Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat. Genet.* *37*, 373–381.
- Firulli, B.A., Redick, B.A., Conway, S.J., and Firulli, A.B. (2007). Mutations within helix I of Twist1 result in distinct limb defects and variation of DNA binding affinities. *J. Biol. Chem.* *282*, 27536–27546.
- Foster, B.A., Coffey, H.A., Morin, M.J., and Rastinejad, F. (1999). Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* *286*, 2507–2510.
- Franco, H.L., Casasnovas, J., Rodríguez-Medina, J.R., and Cadilla, C.L. (2011). Redundant or separate entities?--roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res.* *39*, 1177–1186.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 445–457.
- Fry, D.W., Harvey, P.J., Keller, P.R., Elliott, W.L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W.R., Pryer, N.K., et al. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 1427–1438.

- Fu, J., Qin, L., He, T., Qin, J., Hong, J., Wong, J., Liao, L., and Xu, J. (2011). The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res.* *21*, 275–289.
- Funato, N., Ohtani, K., Ohyama, K., Kuroda, T., and Nakamura, M. (2001). Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7416–7428.
- Gajula, R.P., Chettiar, S.T., Williams, R.D., Thiagarajan, S., Kato, Y., Aziz, K., Wang, R., Gandhi, N., Wild, A.T., Vesuna, F., et al. (2013). The twist box domain is required for Twist1-induced prostate cancer metastasis. *Mol. Cancer Res.* *11*, 1387–1400.
- Galler, K.M., Yasue, A., Cavender, A.C., Bialek, P., Karsenty, G., and D’Souza, R.N. (2007). A novel role for Twist-1 in pulp homeostasis. *J. Dent. Res.* *86*, 951–955.
- Geradts, J., de Herreros, A.G., Su, Z., Burchette, J., Broadwater, G., and Bachelder, R.E. (2011). Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas. *Hum. Pathol.* *42*, 1125–1131.
- El Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A.L., Munnich, A., and Bonaventure, J. (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat. Genet.* *15*, 42–46.
- El Ghouzzi, V., Legeai-Mallet, L., Aresta, S., Benoist, C., Munnich, A., de Gunzburg, J., and Bonaventure, J. (2000). Saethre-Chotzen mutations cause TWIST protein degradation or impaired nuclear location. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 813–819.
- Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 667–677.
- Gitelman, I. (1997). Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* *189*, 205–214.
- Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.-V.F., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Dittullo, R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* *434*, 907–913.
- Gort, E.H., van Haaften, G., Verlaan, I., Groot, A.J., Plasterk, R.H.A., Shvarts, A., Suijkerbuijk, K.P.M., van Laar, T., van der Wall, E., Raman, V., et al. (2008). The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha. *Oncogene* *27*, 1501–1510.
- Gripp, K., Zackai, E., and Stolle, C. (2000a). Mutations in the human TWIST gene. *Hum. Mutat.* *15*, 479.
- Gripp, K.W., Zackai, E.H., and Stolle, C.A. (2000b). Mutations in the human TWIST gene. *Hum. Mutat.* *15*, 150–155.
- Gu, S., Boyer, T.G., and Naski, M.C. (2012). Basic helix-loop-helix transcription factor Twist1 inhibits transactivator function of master chondrogenic regulator Sox9. *J. Biol. Chem.* *287*, 21082–21092.

Gualberto, A., Aldape, K., Kozakiewicz, K., and Tlsty, T.D. (1998). An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 5166–5171.

Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J.L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zürcher-Härdi, U., Bell, G., et al. (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* *148*, 1015–1028.

Haferkamp, S., Tran, S.L., Becker, T.M., Scurr, L.L., Kefford, R.F., and Rizos, H. (2009). The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging (Albany. NY).* *1*, 542–556.

Hamamori, Y., Wu, H.Y., Sartorelli, V., and Kedes, L. (1997). The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6563–6573.

Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P.L., Wu, H.Y., Wang, J.Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* *96*, 405–413.

Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J.W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E.A., Balan, K. V., Pantazis, P., and Wyche, J.H. (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J. Biol. Chem.* *277*, 17154–17160.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* *462*, 595–601.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2002). The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* *277*, 25847–25850.

Hansson, A., Manetopoulos, C., Jönsson, J.I., and Axelson, H. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pTalpha genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1073–1081.

Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* *345*, 458–460.

Haslehurst, A.M., Koti, M., Dharsee, M., Nuin, P., Evans, K., Geraci, J., Childs, T., Chen, J., Li, J., Weberpals, J., et al. (2012). EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* *12*, 91.

HAYFLICK, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* *37*, 614–636.

HAYFLICK, L., and MOORHEAD, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585–621.

Hebrok, M., Wertz, K., and Fuchtbauer, E.M. (1994). M-twist is an inhibitor of muscle differentiation. *Dev. Biol.* *165*, 537–544.

- Heimann, R., Lan, F., McBride, R., and Hellman, S. (2000). Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res.* *60*, 298–304.
- Helleman, J., Smid, M., Jansen, M.P.H.M., van der Burg, M.E.L., and Berns, E.M.J.J. (2010). Pathway analysis of gene lists associated with platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer: the big picture. *Gynecol. Oncol.* *117*, 170–176.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* *14*, 501–513.
- Herman, J.G., Jen, J., Merlo, A., and Baylin, S.B. (1996). Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res.* *56*, 722–727.
- Hoek, K., Rimm, D.L., Williams, K.R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H.M., Berger, A.J., Cheng, E., Trombetta, E.S., et al. (2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* *64*, 5270–5282.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* *460*, 1132–1135.
- Hong, J., Zhou, J., Fu, J., He, T., Qin, J., Wang, L., Liao, L., and Xu, J. (2011). Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res.* *71*, 3980–3990.
- Howard, T.D., Paznekas, W.A., Green, E.D., Chiang, L.C., Ma, N., Ortiz de Luna, R.I., Garcia Delgado, C., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A.D., and Jabs, E.W. (1997). Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat. Genet.* *15*, 36–41.
- Hu, D., Scott, I.C., Snider, F., Geary-Joo, C., Zhao, X., Simmons, D.G., and Cross, J.C. (2013). The basic helix-loop-helix transcription factor Hand1 regulates mouse development as a homodimer. *Dev. Biol.* *382*, 470–481.
- Hupp, T.R., Sparks, A., and Lane, D.P. (1995). Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* *83*, 237–245.
- Hüsemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G., et al. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* *13*, 58–68.
- Imai, T., Horiuchi, A., Wang, C., Oka, K., Ohira, S., Nikaido, T., and Konishi, I. (2003). Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* *163*, 1437–1447.
- Isenmann, S., Arthur, A., Zannettino, A.C.W., Turner, J.L., Shi, S., Glackin, C.A., and Gronthos, S. (2009). TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment. *Stem Cells* *27*, 2457–2468.
- Işeri, O.D., Kars, M.D., Arpacı, F., Atalay, C., Pak, I., and Gündüz, U. (2011). Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomed. Pharmacother.* *65*, 40–45.

Jacobs, J.J.L., and de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.* *14*, 2302–2308.

James, P.A., Culling, B., Mullan, G., Jenkins, M., Elakis, G., Turner, A.M., Mowat, D.M., Wilson, M., Anderson, P., Savarirayan, R., et al. (2009). Breast cancer risk is not increased in individuals with TWIST1 mutation confirmed Saethre-Chotzen syndrome: an Australian multicenter study. *Genes. Chromosomes Cancer* *48*, 533–538.

Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H.E., Saito, Y., Waring, M.T., Dombkowski, D.M., Cheng, T., DePinho, R.A., Sharpless, N.E., and Scadden, D.T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* *443*, 421–426.

Jiang, Z., Deng, T., Jones, R., Li, H., Herschkowitz, J.I., Liu, J.C., Weigman, V.J., Tsao, M.-S., Lane, T.F., Perou, C.M., et al. (2010). Rb deletion in mouse mammary progenitors induces luminal-B or basal-like/EMT tumor subtypes depending on p53 status. *J. Clin. Invest.* *120*, 3296–3309.

Jiang, Z., Jones, R., Liu, J.C., Deng, T., Robinson, T., Chung, P.E.D., Wang, S., Herschkowitz, J.I., Egan, S.E., Perou, C.M., et al. (2011). RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer. *Cell Cycle* *10*, 1563–1570.

Johmura, Y., Shimada, M., Misaki, T., Naiki-Ito, A., Miyoshi, H., Motoyama, N., Ohtani, N., Hara, E., Nakamura, M., Morita, A., et al. (2014). Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol. Cell* *55*, 73–84.

Johnson, D., Iseki, S., Wilkie, A.O., and Morriss-Kay, G.M. (2000). Expression patterns of Twist and Fgfr1, -2 and -3 in the developing mouse coronal suture suggest a key role for twist in suture initiation and biogenesis. *Mech. Dev.* *91*, 341–345.

Kaihara, T., Kusaka, T., Nishi, M., Kawamata, H., Imura, J., Kitajima, K., Itoh-Minami, R., Aoyama, N., Kasuga, M., Oda, Y., et al. (2003). Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *22*, 117–123.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* *449*, 557–563.

Katagiri, A., Watanabe, R., and Tomita, Y. (1995). E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *Br. J. Cancer* *71*, 376–379.

Kee, B.L. (2009). E and ID proteins branch out. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 175–184.

Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* *127*, 265–275.

Kim, A.L., Raffo, A.J., Brandt-Rauf, P.W., Pincus, M.R., Monaco, R., Abarzua, P., and Fine, R.L. (1999). Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 34924–34931.

- Kim, S.-H., Rowe, J., Fujii, H., Jones, R., Schmierer, B., Kong, B.-W., Kuchler, K., Foster, D., Ish-Horowicz, D., and Peters, G. (2006). Upregulation of chicken p15INK4b at senescence and in the developing brain. *J. Cell Sci.* *119*, 2435–2443.
- Knudsen, E.S., and Wang, J.Y.J. (2010). Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* *16*, 1094–1099.
- Kogan-Sakin, I., Tabach, Y., Buganim, Y., Molchadsky, A., Solomon, H., Madar, S., Kamer, I., Stambolsky, P., Shelly, A., Goldfinger, N., et al. (2011). Mutant p53(R175H) upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition in immortalized prostate cells. *Cell Death Differ.* *18*, 271–281.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., et al. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* *89*, 755–764.
- Kondo, M., Wagers, A.J., Manz, M.G., Prohaska, S.S., Scherer, D.C., Beilhack, G.F., Shizuru, J.A., and Weissman, I.L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 759–806.
- Krimpenfort, P., Ijpenberg, A., Song, J.-Y., van der Valk, M., Nawijn, M., Zevenhoven, J., and Berns, A. (2007). p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature* *448*, 943–946.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* *114*, 1299–1307.
- Krizhanovsky, V., and Lowe, S.W. (2009). Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature* *460*, 1085–1086.
- Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 81–94.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* *133*, 1019–1031.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* *113* ( Pt 2), 3613–3622.
- Kwok, W.K., Ling, M.-T., Yuen, H.F., Wong, Y.-C., and Wang, X. (2007). Role of p14ARF in TWIST-mediated senescence in prostate epithelial cells. *Carcinogenesis* *28*, 2467–2475.
- LaGamba, D., Nawshad, A., and Hay, E.D. (2005). Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Dev. Dyn.* *234*, 132–142.
- Land, H., Parada, L.F., and Weinberg, R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* *304*, 596–602.



- Lander, R., Nordin, K., and LaBonne, C. (2011). The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1. *J. Cell Biol.* 194, 17–25.
- Lander, R., Nasr, T., Ochoa, S.D., Nordin, K., Prasad, M.S., and Labonne, C. (2013). Interactions between Twist and other core epithelial-mesenchymal transition factors are controlled by GSK3-mediated phosphorylation. *Nat. Commun.* 4, 1542.
- De Lange, T. (2009). How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326, 948–952.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., and Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8263–8267.
- Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Martín, J., Ortega, S., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Cordon-Cardo, C., and Barbacid, M. (2000). Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* 19, 3496–3506.
- Laursen, K.B., Mielke, E., Iannaccone, P., and Füchtbauer, E.-M. (2007). Mechanism of transcriptional activation by the proto-oncogene Twist1. *J. Biol. Chem.* 282, 34623–34633.
- Lee, K.E., and Bar-Sagi, D. (2010). Oncogenic KRas suppresses inflammation-associated senescence of pancreatic ductal cells. *Cancer Cell* 18, 448–458.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.
- Lee, M.S., Lowe, G.N., Strong, D.D., Wergedal, J.E., and Glackin, C.A. (1999). TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage. *J. Cell. Biochem.* 75, 566–577.
- Leshem, Y., Spicer, D.B., Gal-Levi, R., and Halevy, O. (2000). Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits skeletal muscle cell differentiation: a role for the bHLH protein twist and the cdk inhibitor p27. *J. Cell. Physiol.* 184, 101–109.
- Li, C.-W., Xia, W., Huo, L., Lim, S.-O., Wu, Y., Hsu, J.L., Chao, C.-H., Yamaguchi, H., Yang, N.-K., Ding, Q., et al. (2012a). Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- $\alpha$  requires NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* 72, 1290–1300.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Cañamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460, 1136–1139.
- Li, L., Cserjesi, P., and Olson, E.N. (1995). Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev. Biol.* 172, 280–292.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K.U., Young, W.S., Hennighausen, L., and Furth, P.A. (1997). Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3425–3430.



- Li, S., Kendall, S.E., Raices, R., Finlay, J., Covarrubias, M., Liu, Z., Lowe, G., Lin, Y.-H., Teh, Y.H., Leigh, V., et al. (2012b). TWIST1 associates with NF- $\kappa$ B subunit RELA via carboxyl-terminal WR domain to promote cell autonomous invasion through IL8 production. *BMC Biol.* *10*, 73.
- Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* *12*, 3008–3019.
- Liu, Y., El-Naggar, S., Darling, D.S., Higashi, Y., and Dean, D.C. (2008). Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development* *135*, 579–588.
- Liu, Y., Lu, X., Huang, L., Wang, W., Jiang, G., Dean, K.C., Clem, B., Telang, S., Jenson, A.B., Cuatrecasas, M., et al. (2014). Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nat. Commun.* *5*, 5660.
- Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1964). Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J. Insect Physiol.* *10*, 643–649.
- López-Novoa, J.M., and Nieto, M.A. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol. Med.* *1*, 303–314.
- Lu, M., Miller, P., and Lu, X. (2014). Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy. *FEBS Lett.* *588*, 2616–2621.
- Lydall, D. (2009). Taming the tiger by the tail: modulation of DNA damage responses by telomeres. *EMBO J.* *28*, 2174–2187.
- Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* *13*, 2207–2217.
- Magenta, A., Cencioni, C., Fasanaro, P., Zaccagnini, G., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Antonini, A., Martelli, F., and Capogrossi, M.C. (2011). miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death Differ.* *18*, 1628–1639.
- Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.-F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* *21*, 43–48.
- Malumbres, M., Pérez De Castro, I., Hernández, M.I., Jiménez, M., Corral, T., and Pellicer, A. (2000). Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2915–2925.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* *133*, 704–715.
- Martin, A., and Cano, A. (2010). Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. *Nat. Cell Biol.* *12*, 924–925.

- Martin, L., and Schilder, R.J. (2006). Novel non-cytotoxic therapy in ovarian cancer: current status and future prospects. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* *4*, 955–966.
- Martin, T.A., Goyal, A., Watkins, G., and Jiang, W.G. (2005). Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* *12*, 488–496.
- Massari, M.E., and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 429–440.
- Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* *114*, 241–253.
- Matheu, A., Pantoja, C., Efeyan, A., Criado, L.M., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., and Serrano, M. (2004). Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev.* *18*, 2736–2746.
- McConkey, D.J., Choi, W., Marquis, L., Martin, F., Williams, M.B., Shah, J., Svatek, R., Das, A., Adam, L., Kamat, A., et al. (2009). Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 335–344.
- McDonald, O.G., Wu, H., Timp, W., Doi, A., and Feinberg, A.P. (2011). Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 867–874.
- McKeen, E.A., Mulvihill, J.J., Levine, P.H., Dean, J.H., and Howley, P.M. (1984). The concurrence of Saethre-Chotzen syndrome and malignancy in a family with in vitro immune dysfunction. *Cancer* *54*, 2946–2951.
- Mejlvang, J., Kriajevska, M., Vandewalle, C., Chernova, T., Sayan, A.E., Berx, G., Mellon, J.K., and Tulchinsky, E. (2007). Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4615–4624.
- Meng, A., Wang, Y., Van Zant, G., and Zhou, D. (2003). Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res.* *63*, 5414–5419.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* *444*, 638–642.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* *436*, 720–724.
- Molofsky, A. V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E., and Morrison, S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* *443*, 448–452.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* *3*, e2888.

- Morel, A.-P., Hinkal, G.W., Thomas, C., Fauvet, F., Courtois-Cox, S., Wierinckx, A., Devouassoux-Shisheboran, M., Treilleux, I., Tissier, A., Gras, B., et al. (2012). EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet.* 8, e1002723.
- Mountz, J.D., Zhou, T., Su, X., Cheng, J., Pierson, M., Bluethmann, H., and Edwards, C.K. (1996). Autoimmune disease results from multiple interactive defects in apoptosis induction molecules and signaling pathways. *Behring Inst. Mitt.* 200–219.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* 98, 1512–1520.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C. V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., and Lassar, A.B. (1989a). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537–544.
- Murre, C., McCaw, P.S., and Baltimore, D. (1989b). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777–783.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716.
- Nelyudova, A., Aksenov, N., Pospelov, V., and Pospelova, T. (2007). By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell Cycle* 6, 2171–2177.
- Niesner, U., Albrecht, I., Janke, M., Doebeis, C., Loddenkemper, C., Lexberg, M.H., Eulenburg, K., Kreher, S., Koeck, J., Baumgrass, R., et al. (2008). Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1. *J. Exp. Med.* 205, 1889–1901.
- Nieto, M.A. (2001). The early steps of neural crest development. *Mech. Dev.* 105, 27–35.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.
- Ocaña, O.H., Córcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., and Nieto, M.A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* 22, 709–724.
- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., Takatsuka, Y., Matsuyoshi, N., Hirano, S., and Takeichi, M. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res.* 53, 1696–1701.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L., and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358, 80–83.
- Olovnikov, A.M. (1996). Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp. Gerontol.* 31, 443–448.

- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.
- Pallier, K., Cessot, A., Côté, J.-F., Just, P.-A., Cazes, A., Fabre, E., Danel, C., Riquet, M., Devouassoux-Shisheboran, M., Ansieau, S., et al. (2012). TWIST1 a new determinant of epithelial to mesenchymal transition in EGFR mutated lung adenocarcinoma. *PLoS One* 7, e29954.
- Pan, D., Fujimoto, M., Lopes, A., and Wang, Y.-X. (2009). Twist-1 is a PPARdelta-inducible, negative-feedback regulator of PGC-1alpha in brown fat metabolism. *Cell* 137, 73–86.
- Pantel, K., and Brakenhoff, R.H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer* 4, 448–456.
- Parant, J., Chavez-Reyes, A., Little, N.A., Yan, W., Reinke, V., Jochemsen, A.G., and Lozano, G. (2001). Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat. Genet.* 29, 92–95.
- Park, J.I., Jeong, J.S., Han, J.Y., Kim, D.I., Gao, Y.H., Park, S.C., Rodgers, G.P., and Kim, I.H. (2000). Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126, 455–460.
- Pavey, S., Conroy, S., Russell, T., and Gabrielli, B. (1999). Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res.* 59, 4185–4189.
- Pazgier, M., Liu, M., Zou, G., Yuan, W., Li, C., Li, C., Li, J., Monbo, J., Zella, D., Tarasov, S.G., et al. (2009). Structural basis for high-affinity peptide inhibition of p53 interactions with MDM2 and MDMX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4665–4670.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415–428.
- Pham, D., Vincentz, J.W., Firulli, A.B., and Kaplan, M.H. (2012). Twist1 regulates Ifng expression in Th1 cells by interfering with Runx3 function. *J. Immunol.* 189, 832–840.
- Piccinin, S., Tonin, E., Sessa, S., Demontis, S., Rossi, S., Pecciarini, L., Zanatta, L., Pivetta, F., Grizzo, A., Sonego, M., et al. (2012). A “twist box” code of p53 inactivation: twist box: p53 interaction promotes p53 degradation. *Cancer Cell* 22, 404–415.
- Podsypanina, K., Du, Y.-C.N., Jechlinger, M., Beverly, L.J., Hambardzumyan, D., and Varmus, H. (2008). Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science* 321, 1841–1844.
- Te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 62, 1876–1883.
- Popov, N., and Gil, J. (2010). Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health. *Epigenetics* 5, 685–690.

Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., and Ansieau, S. (2006). A twist for survival and cancer progression. *Br. J. Cancer* 94, 13–17.

Qiang, L., Zhao, B., Ming, M., Wang, N., He, T.-C., Hwang, S., Thorburn, A., and He, Y.-Y. (2014). Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9241–9246.

Qin, Q., Xu, Y., He, T., Qin, C., and Xu, J. (2012). Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res.* 22, 90–106.

Razvi, E.S., Jiang, Z., Woda, B.A., and Welsh, R.M. (1995). Lymphocyte apoptosis during the silencing of the immune response to acute viral infections in normal, lpr, and Bcl-2-transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 147, 79–91.

Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P.M., and Mirkin, B.L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 22, 2805–2811.

Rees, J.R.E., Onwuegbusi, B.A., Save, V.E., Alderson, D., and Fitzgerald, R.C. (2006). In vivo and in vitro evidence for transforming growth factor-beta1-mediated epithelial to mesenchymal transition in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 66, 9583–9590.

Reimann, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Dörr, J.R., Tabor, V., Aichele, P., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2010). Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell* 17, 262–272.

Reynisdóttir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massagué, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 9, 1831–1845.

Rice, D.P., Aberg, T., Chan, Y., Tang, Z., Kettunen, P.J., Pakarinen, L., Maxson, R.E., and Thesleff, I. (2000). Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* 127, 1845–1855.

Rieux-Laucat, F., Fischer, A., and Deist, F. Le (2003). Cell-death signaling and human disease. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 325–331.

Roig, J.M., Molina, M.A., Cascante, A., Calbó, J., Carbó, N., Wirtz, U., Sreedharan, S., Fillat, C., and Mazo, A. (2004). Adenovirus-mediated retinoblastoma 94 gene transfer induces human pancreatic tumor regression in a mouse xenograft model. *Clin. Cancer Res.* 10, 1454–1462.

Sahlin, P., Windh, P., Lauritzen, C., Emanuelsson, M., Grönberg, H., and Stenman, G. (2007). Women with Saethre-Chotzen syndrome are at increased risk of breast cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 46, 656–660.

Samejima, K., Tone, S., and Earnshaw, W.C. (2001). CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 45427–45432.

Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D.S., Dean, D.C., Castells, A., and Postigo, A. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3429–3456.

- Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., and Haslett, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* *83*, 865–875.
- Sayan, a E., Griffiths, T.R., Pal, R., Browne, G.J., Ruddick, A., Yagci, T., Edwards, R., Mayer, N.J., Qazi, H., Goyal, S., et al. (2009). SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14884–14889.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M., and Lowe, S.W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* *109*, 335–346.
- Schwarze, S.R., Fu, V.X., Desotelle, J.A., Kenowski, M.L., and Jarrard, D.F. (2005). The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia* *7*, 816–823.
- Schwoebel, E.D., and Moore, M.S. (2000). The control of gene expression by regulated nuclear transport. *Essays Biochem.* *36*, 105–113.
- Seifert, G., Kress, W., Meisel, C., Henze, G., and Seeger, K. (2006). Genetic investigations of Saethre-Chotzen syndrome presenting with renal cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* *171*, 76–78.
- Selivanova, G., Iotsova, V., Okan, I., Fritsche, M., Ström, M., Groner, B., Grafström, R.C., and Wiman, K.G. (1997). Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat. Med.* *3*, 632–638.
- Selmi, A., de Saint-Jean, M., Jallas, A.-C., Garin, E., Hogarty, M.D., Bénard, J., Puisieux, A., Marabelle, A., and Valsesia-Wittmann, S. (2014). TWIST1 is a direct transcriptional target of MYCN and MYC in neuroblastoma. *Cancer Lett.*
- Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2001). Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1552–1564.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593–602.
- Setleis, H., Kramer, B., Valcarcel, M., and Einhorn, A.H. (1963). CONGENITAL ECTODERMAL DYSPLASIA OF THE FACE. *Pediatrics* *32*, 540–548.
- Shamir, E.R., Pappalardo, E., Jorgens, D.M., Coutinho, K., Tsai, W.-T., Aziz, K., Auer, M., Tran, P.T., Bader, J.S., and Ewald, A.J. (2014). Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. *J. Cell Biol.* *204*, 839–856.
- Shapiro, I.M., Cheng, A.W., Flytzanis, N.C., Balsamo, M., Condeelis, J.S., Oktay, M.H., Burge, C.B., and Gertler, F.B. (2011). An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genet.* *7*, e1002218.
- Sharabi, A.B., Aldrich, M., Sosic, D., Olson, E.N., Friedman, A.D., Lee, S.-H., and Chen, S.-Y. (2008). Twist-2 controls myeloid lineage development and function. *PLoS Biol.* *6*, e316.



- Shaulsky, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1991). Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res.* 51, 5232–5237.
- Shen, J., Sun, H., Xu, P., Yin, Q., Zhang, Z., Wang, S., Yu, H., and Li, Y. (2013). Simultaneous inhibition of metastasis and growth of breast cancer by co-delivery of twist shRNA and paclitaxel using pluronic P85-PEI/TPGS complex nanoparticles. *Biomaterials* 34, 1581–1590.
- Shi, J., Wang, Y., Zeng, L., Wu, Y., Deng, J., Zhang, Q., Lin, Y., Li, J., Kang, T., Tao, M., et al. (2014). Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 25, 210–225.
- Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Takahashi, M., Naito, S., and Kohno, K. (2008). Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. *Oncogene* 27, 5543–5553.
- Sidransky, D., Frost, P., Von Eschenbach, A., Oyasu, R., Preisinger, A.C., and Vogelstein, B. (1992). Clonal origin bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 326, 737–740.
- Simpson, P. (1983). Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics* 105, 615–632.
- Singh, S., and Gramolini, A.O. (2009). Characterization of sequences in human TWIST required for nuclear localization. *BMC Cell Biol.* 10, 47.
- Slattery, C., Ryan, M.P., and McMorro, T. (2008). E2A proteins: regulators of cell phenotype in normal physiology and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1431–1436.
- Šošić, D., Richardson, J.A., Yu, K., Ornitz, D.M., and Olson, E.N. (2003). Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell* 112, 169–180.
- Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Berx, G., Eger, A., Merkel, S., Jung, A., Kirchner, T., and Brabletz, T. (2006). A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 131, 830–840.
- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 447–458.
- Spicer, D.B., Rhee, J., Cheung, W.L., and Lassar, A.B. (1996). Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 272, 1476–1480.
- Stankiewicz, P., Thiele, H., Baldermann, C., Krüger, A., Giannakudis, I., Dörr, S., Werner, N., Kunz, J., Rappold, G.A., and Hansmann, I. (2001). Phenotypic findings due to trisomy 7p15.3-pter including the TWIST locus. *Am. J. Med. Genet.* 103, 56–62.
- Stasinopoulos, I.A., Mironchik, Y., Raman, A., Wildes, F., Winnard, P., and Raman, V. (2005). HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 280, 2294–2299.



- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2109–2117.
- Su, Y.-W., Xie, T.-X., Sano, D., and Myers, J.N. (2011). IL-6 stabilizes Twist and enhances tumor cell motility in head and neck cancer cells through activation of casein kinase 2. *PLoS One* *6*, e19412.
- Takahashi, E., Funato, N., Higashihori, N., Hata, Y., Gridley, T., and Nakamura, M. (2004). Snail regulates p21(WAF/CIP1) expression in cooperation with E2A and Twist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *325*, 1136–1144.
- Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* *13*, 1549–1556.
- Tarin, D., Thompson, E.W., and Newgreen, D.F. (2005). The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.* *65*, 5996–6000; discussion 6000–6001.
- Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., et al. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15449–15454.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 442–454.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871–890.
- Thisse, B., el Messal, M., and Perrin-Schmitt, F. (1987). The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res.* *15*, 3439–3453.
- Tran, D.D., Corsa, C.A.S., Biswas, H., Aft, R.L., and Longmore, G.D. (2011). Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. *Mol. Cancer Res.* *9*, 1644–1657.
- Tran, P.T., Shroff, E.H., Burns, T.F., Thiyagarajan, S., Das, S.T., Zabuawala, T., Chen, J., Cho, Y.-J., Luong, R., Tamayo, P., et al. (2012). Twist1 suppresses senescence programs and thereby accelerates and maintains mutant Kras-induced lung tumorigenesis. *PLoS Genet.* *8*, e1002650.
- Trelstad, R.L., Hay, E.D., and Revel, J.D. (1967). Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* *16*, 78–106.
- Trimboli, A.J., Fukino, K., de Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., et al. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* *68*, 937–945.
- Trost, T.M., Lausch, E.U., Fees, S.A., Schmitt, S., Enklaar, T., Reutzel, D., Brixel, L.R., Schmidtke, P., Maringer, M., Schiffer, I.B., et al. (2005). Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. *Cancer Res.* *65*, 840–849.

- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 22, 725–736.
- Tukel, T., Šošić, D., Al-Gazali, L.I., Erazo, M., Casasnovas, J., Franco, H.L., Richardson, J.A., Olson, E.N., Cadilla, C.L., and Desnick, R.J. (2010). Homozygous nonsense mutations in TWIST2 cause Setleis syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 289–296.
- Uchida, T., Kinoshita, T., Nagai, H., Nakahara, Y., Saito, H., Hotta, T., and Murate, T. (1997). Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* 90, 1403–1409.
- Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T.K., Hampton, G.M., and Wahl, G.M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell* 9, 1031–1044.
- Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.-C., Combaret, V., Krause, A., Leissner, P., and Puisieux, A. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 6, 625–630.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848.
- Vaughn, D.J., Flaherty, K., Lal, P., Gallagher, M., O'Dwyer, P., Wilner, K., Chen, I., and Schwartz, G. (2009). Treatment of growing teratoma syndrome. *N. Engl. J. Med.* 360, 423–424.
- Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* 8, 279–282.
- Vega, S., Morales, A. V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 18, 1131–1143.
- Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661–665.
- Vichalkovski, A., Gresko, E., Hess, D., Restuccia, D.F., and Hemmings, B.A. (2010). PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene* 29, 3554–3565.
- Vogan, K., Bernstein, M., Leclerc, J.M., Brisson, L., Brossard, J., Brodeur, G.M., Pelletier, J., and Gros, P. (1993). Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res.* 53, 5269–5273.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., and Feinberg, A.P. (1985). Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science* 227, 642–645.
- Vogt C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricans).

- Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* 4, 311–319.
- Wallberg-Henriksson, H., and Zierath, J.R. (2009). A new twist on brown fat metabolism. *Cell* 137, 22–24.
- Wang, H., Wang, H.-S., Zhou, B.-H., Li, C.-L., Zhang, F., Wang, X.-F., Zhang, G., Bu, X.-Z., Cai, S.-H., and Du, J. (2013). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF- $\alpha$  requires AKT/GSK-3 $\beta$ -mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PLoS One* 8, e56664.
- Wang, S.M., Coljee, V.W., Pignolo, R.J., Rotenberg, M.O., Cristofalo, V.J., and Sierra, F. (1997). Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* 187, 83–92.
- Wang, S.-P., Wang, W.-L., Chang, Y.-L., Wu, C.-T., Chao, Y.-C., Kao, S.-H., Yuan, A., Lin, C.-W., Yang, S.-C., Chan, W.-K., et al. (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat. Cell Biol.* 11, 694–704.
- Wang, X., Wong, S.C., Pan, J., Tsao, S.W., Fung, K.H., Kwong, D.L., Sham, J.S., and Nicholls, J.M. (1998a). Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res.* 58, 5019–5022.
- Wang, X.J., Greenhalgh, D.A., Jiang, A., He, D., Zhong, L., Brinkley, B.R., and Roop, D.R. (1998b). Analysis of centrosome abnormalities and angiogenesis in epidermal-targeted p53<sup>172H</sup> mutant and p53-knockout mice after chemical carcinogenesis: evidence for a gain of function. *Mol. Carcinog.* 23, 185–192.
- Warzecha, C.C., and Carstens, R.P. (2012). Complex changes in alternative pre-mRNA splicing play a central role in the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Semin. Cancer Biol.* 22, 417–427.
- Watanabe, O., Imamura, H., Shimizu, T., Kinoshita, J., Okabe, T., Hirano, A., Yoshimatsu, K., Konno, S., Aiba, M., and Ogawa, K. (2004). Expression of twist and wnt in human breast cancer. *Anticancer Res.* 24, 3851–3856.
- Watson, C.J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res.* 8, 203.
- Wei, S., and Sedivy, J.M. (1999). Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res.* 59, 1539–1543.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., et al. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 11, 1487–1495.
- Whitehead, J., Vignjevic, D., Fütterer, C., Beaupaire, E., Robine, S., and Farge, E. (2008). Mechanical factors activate beta-catenin-dependent oncogene expression in APC mouse colon. *HFSP J.* 2, 286–294.
- Wiman, K.G. (2010). Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 29, 4245–4252.

- Wolf, D., Harris, N., and Rotter, V. (1984). Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* *38*, 119–126.
- Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F., and Liotta, L.A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer* *80*, 1529–1537.
- Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W., and Shay, J.W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* *18*, 173–179.
- Wu, W.-S., Heinrichs, S., Xu, D., Garrison, S.P., Zambetti, G.P., Adams, J.M., and Look, A.T. (2005). Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* *123*, 641–653.
- Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P.G., Qiu, S., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2009). Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* *15*, 416–428.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* *445*, 656–660.
- Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* *14*, 818–829.
- Yang, G., Rosen, D.G., Zhang, Z., Bast, R.C., Mills, G.B., Colacino, J.A., Mercado-Urbe, I., and Liu, J. (2006). The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 16472–16477.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* *117*, 927–939.
- Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., and Wu, K.-J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* *10*, 295–305.
- Yang, M.-H., Hsu, D.S.-S., Wang, H.-W., Wang, H.-J., Lan, H.-Y., Yang, W.-H., Huang, C.-H., Kao, S.-Y., Tzeng, C.-H., Tai, S.-K., et al. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* *12*, 982–992.
- Yoshida, R., Kimura, N., Harada, Y., and Ohuchi, N. (2001). The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int. J. Oncol.* *18*, 513–520.
- Yousfi, M., Lasmoles, F., and Marie, P.J. (2002a). TWIST inactivation reduces CBFA1/RUNX2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *297*, 641–644.
- Yousfi, M., Lasmoles, F., El Ghouzzi, V., and Marie, P.J. (2002b). Twist haploinsufficiency in Saethre-Chotzen syndrome induces calvarial osteoblast apoptosis due to increased TNFalpha expression and caspase-2 activation. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 359–369.

Zhang, K., Zhaos, J., Liu, X., Yan, B., Chen, D., Gao, Y., Hu, X., Liu, S., Zhang, D., and Zhou, C. (2011). Activation of NF- $\kappa$ B upregulates Snail and consequent repression of E-cadherin in cholangiocarcinoma cell invasion. *Hepatogastroenterology*. *58*, 1–7.

Zhang, X., Multani, A.S., Zhou, J.-H., Shay, J.W., McConkey, D., Dong, L., Kim, C.-S., Rosser, C.J., Pathak, S., and Benedict, W.F. (2003). Adenoviral-mediated retinoblastoma 94 produces rapid telomere erosion, chromosomal crisis, and caspase-dependent apoptosis in bladder cancer and immortalized human urothelial cells but not in normal urothelial cells. *Cancer Res.* *63*, 760–765.

Zheng, X., Chou, P.M., Mirkin, B.L., and Rebbaa, A. (2004). Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L. *Cancer Res.* *64*, 1773–1780.

Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J.M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* *12*, 2997–3007.

Zhuge, X., Kataoka, H., Tanaka, M., Murayama, T., Kawamoto, T., Sano, H., Togi, K., Yamauchi, R., Ueda, Y., Xu, Y., et al. (2005). Expression of the novel Snai-related zinc-finger transcription factor gene Smuc during mouse development. *Int. J. Mol. Med.* *15*, 945–948.

Zindy, F., Quelle, D.E., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* *15*, 203–211.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* *12*, 2424–2433.